

Pathophysiological and molecular mechanisms involved in renal congestion

著者	島田 佐登志
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18520号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126026

Pathophysiological and molecular mechanisms involved in renal congestion

[腎うっ血における腎障害の病態生理学的小よび分子的機序の解明]

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
内科病態学講座腎・高血圧・内分泌学分野
島田 佐登志

目次

I.	要約	5
II.	研究背景	6
III.	研究目的	7
IV.	研究方法	7
V.	研究結果	14
VI.	考察	18
VII.	結論	25
VIII.	謝辞	27
IX.	文献	28
X.	図	33
XI.	表	56

略語

本文並び図表中に以下の略語を使用した。

AQP2 (Aquaporin; アクアポリン)

BSA (bovine serum albumin; ウシ血清アルブミン)

DAB (3,3'-diaminobenzidine; 四塩酸 3,3'-ジアミノベンジジン)

FITC (fluoresceinyl isothiocyanate; フルオレセインイソチオシアナート)

FN1 (Fibronectin1; フィブロネクチン)

GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素)

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinnethanesulfonic acid; 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)

KIM1 (Kidney injury molecule1; 腎臓傷害分子)

L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; NG-ニトロアルギニンメチルエステル)

LCN2 (Lipocalin2; リポカリン 2)

LVSEM (low-voltage scanning electron microscope; 低真空走査型電子顕微鏡)

OPN (Osteopontin; オステオポンチン)

PDGFR (platelet-derived growth factor; 血小板由来増殖因子受容体)

PE (Polyethylene; ポリエチレン)

PMT (pericyte-myofibroblast transition; ペリサイトー筋線維芽細胞転換)

SD (Sprague-Dawley; スプラーグドーリー)

TAGLN (Transgelin; トランスゲリン)

Umod (Uromodulin; ウロモジュリン)

VIM (Vimentin; ビメンチン)

α -SMA (α -Smooth muscle actin; α -平滑筋アクチン)

博士論文の基礎となる論文

本研究の研究成果は以下の公表論文として学術誌に掲載された。

Satoshi Shimada, Takuo Hirose, Chika Takahashi, Emiko Sato, Satoshi Kinugasa, Yusuke Ohsaki, Kiyomi Kisu, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, Takefumi Mori.

Pathophysiological and molecular mechanisms involved in renal congestion in a novel rat model.

Scientific Reports. volume 8, Article number: 16808 (2018)

I. 要約

心臓と腎臓は、体液量や血行動態を調整することで恒常性を維持しており、心腎連関と呼ばれる。近年、中心静脈圧の上昇が腎障害の原因となっていることが示されたが、その機序については不明である。我々は、中心静脈圧が上昇することで腎静脈圧が上昇し、これに伴う腎間質静水圧の上昇と直血管の拡張が腎うっ血による線維化の原因となると仮説をたてた。本仮説を検証するために、新たなラットの腎うっ血モデルを作製し、このモデルを用いて血行動態と分子機序について検討した。

8-9 週齢の雄性 SD (Sprague-Dawley; スプラグドローリー)ラットの左右腎静脈間中心静脈を絹製縫合糸で結紮することにより上流の中心静脈圧を上昇させ、左腎のみうっ血状態となり、右腎はうっ血状態にならない新たなラットモデルを作製した。急性期反応は生理学的実験手法により検討した。加えて、うっ血に伴う分子機序を解明するために、マイクロアレイを実施し、左右腎の遺伝子発現量を比較した。機能的・構造的特徴については免疫組織化学と電子顕微鏡を用いて検討した。

うっ血側の腎皮質・髄質の血流は低下し、糸球体濾過量も低下した。加えて、腎間質静水圧は上昇した。また、うっ血側腎髄質のヘンレループの太い上行脚が低酸素状態となっていることが確認された。うっ血側腎では、尿細管・間質障害、足細胞障害、アルブミン尿、クレアチニン・クリアランスの低下が確認された。マイクロアレイ解析ではうっ血側において細胞外マトリックス、焦点接着、尿細管障害に関連する遺伝子の発現が亢進していた。特に、ペリサイトー筋線維芽細胞転換を引き起こす血小板由来増殖因子受容体タンパク質の発現が著明に亢進していた。電子顕微鏡により、うっ血側腎において、直血管周囲のペリサイトの脱落が確認された。これらの糸球体障害・尿細管間質障害は腎皮膜除去により改善した。また、血小板由来増殖因子受容体を阻害するイマチニブを投与することで、間質障害が改善した。

今回の新規腎うっ血モデルでの検討から、腎うっ血に伴い尿細管周囲毛細血管と尿細管が圧縮されることにより、低酸素と物理的刺激がペリサイトの脱落と足細胞障害を引き起こし、その結果として細胞外マトリックスの拡大と、尿細管障害が引き起こされることが解明された。

II. 研究背景

心臓と腎臓の生理学的連携が近年注目されている。うっ血性心不全の患者では、健康人と比較して中心静脈圧と腎静脈圧が高いことが知られている¹⁾。Mullens 等は、代償性心不全患者において心係数の低下よりもむしろ中心静脈圧の上昇が糸球体濾過量の減少と関連が強いことを報告している²⁾。さらに、Damman 等は、中心静脈圧の上昇が糸球体濾過量の低下と関連しており、死亡リスクの強力な予測因子であることを示している³⁾。従って、心不全下における中心静脈圧の上昇は腎機能障害進行の予測因子であると考えられる。しかし、なぜ中心静脈圧が上昇すると腎機能障害が進行するのかという機序についてはまだ十分に解明されていない。

動物実験においても、中心静脈圧の上昇による腎静脈圧上昇が腎うっ血を引き起こし、腎機能障害が進行するという現象が既に報告されている^{4,5)}。腎静脈に狭窄を作ることによって腎静脈圧を上昇させるという急性期の実験が種々の動物を用いて行われている。腎静脈圧の上昇に伴い、うっ血側腎の間質静水圧の上昇、総腎血流の低下がおこり、その結果としてナトリウムの保持と尿量の低下がおこるとされている⁶⁻⁸⁾。両側腎静脈上で下大静脈の結紮を行うモデルでは腎静脈圧の上昇がみられ⁹⁾、慢性的な腎機能障害が引き起こされることが示されている^{10,11)}。

腎間質静水圧の上昇するラットの尿管結紮や腎動脈狭窄モデルでは、腎障害が生じる¹²⁻¹⁴⁾。これらのモデルの腎障害には上皮間葉転換を介した線維化が関与していると考えられている^{14,15)}。近年、腎臓に限らず様々な臓器の線維化に関与する機序として、PMT (pericyte-myofibroblast transition; ペリサイトー筋線維芽細胞転換)という新しい説が提唱されている¹⁶⁾。また、その他の機序により線維化が起こされるという報告もある¹⁷⁾。しかし、腎うっ血が分子生物学的にどのような変化をもたらすのか、またそれがどのように腎障害に結びつくのかについてはほとんど知られていない。

そこで我々は、腎間質静水圧と直血管の拡張が腎うっ血による線維化の原因であると仮説をたて、これを検証するため、ラットの新規腎うっ血モデルを作製した。このラット新規腎うっ血モデルは左右の腎静脈間で下大静脈を結紮することにより、同一個体においてうっ血した左腎と、うっ血をしていない右腎を比較することが可能であ

る。このモデルを用いて腎うっ血の血行動態に与える影響を生理学的実験手法により検討した。また、腎うっ血モデルに関する多くの既報ではうっ血による急性期反応しか検討しておらず、我々の知る限りにおいて分子機序に焦点を当てたものはない。従って、我々は腎うっ血における腎障害の亜急性期の分子生物学的機序についても検討を行った。腎うっ血における分子機序を解明するために、マイクロアレイ解析を行い同一個体の左右腎で比較をした。加えて、機能的変化や構造的変化を調べるために、免疫組織化学や電子顕微鏡による検討を行った。

III. 研究目的

本研究は、腎うっ血が分子生物学的にどのような変化をもたらすのか、またそれがどのように腎障害に結びつくのかを明らかにすることを目的とした。

IV. 研究方法

・ IV-1. 実験動物

すべての動物実験は、国立大学法人東北大学により作成された「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」および「実験動物の管理と使用に関する指針」に基づいて行った。また、本研究の動物実験計画は国立大学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の承認を得ている(登録番号: 2017 医動-318、2018 薬動-026)。雄性 SD ラット (7-9 週齢、250-350 g) を日本エスエルシー株式会社(静岡, 日本)より購入し、温度 ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) が一定で 12 時間毎に昼夜が入れ替わる環境下で飼育した。餌は日本農産工業株式会社(横浜, 日本)より購入したラボ MR ストックを用い、摂食・飲水については自由に行わせた。また、動物が搬入されてから最低 3 日間の順応期間をおいてから動物実験を行った。

・ IV-2. 左右腎静脈間中心静脈結紮術による急性期腎血行動態の変化

・ IV-2-(1). 血圧の測定、下大静脈圧の測定、糸球体濾過量の測定

ラットをケタミン(20 mg/kg、筋肉内投与)とイナクチン(50 mg/kg、腹腔内投与)により麻酔し、37°Cに設定をした手術台の上に配置した。呼吸を保持するために PE (Polyethylene; ポリエチレン) 240 を気管内挿管し、補液は左頸静脈より行った。動脈圧を測定するために PE 50 を左大腿動脈に挿入した。下大静脈圧を左右腎静脈分岐部でそれぞれ測定するために、左右大腿静脈より PE 50 を挿入し一方を左腎静脈分岐部付近に、他方を右腎静脈分岐部付近に留置した(図 1A-F)。また、分腎尿を回収するために、左右の尿管それぞれに PE 50 を挿入した。動脈圧と中心静脈圧はパワーラブシステム(AD インストルメンツ社, シドニー, オーストラリア)を用いて測定した。糸球体濾過量の測定は以下に示すように、既報と同様に蛍光イヌリンを用いて行った¹⁸⁾。2.0% BSA (bovine serum albumin; 牛血清アルブミン)と 2.0 mg/mL FITC (fluoresceinyl isothiocyanate; フルオレセインイソチオシアナート)で標識された蛍光イヌリンを生理食塩水に混和し、1.0 mL/100 g 体重/時の流速で左頸静脈より投与した。血圧・尿量などが安定するまで1時間静置したのちに、動脈圧、中心静脈圧を1時間測定し、ベースライン値とした。その後、3-0 絹製縫合糸で右腎静脈分岐部に留置したカテーテルを含有するように中心静脈を結紮し、2時間計測を続けた。採血は、各実験の前後に左大腿動脈カテーテルより 500 μ L ずつ行い、尿は 30 分ごとに回収し、尿量を測定した。緩衝剤として 10mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinnethanesulfonic acid; 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)を含有した生理食塩水で尿・血清を希釈し、励起 485 nm 排出 538 nm で蛍光強度を測定してイヌリン濃度を算出し、以下の式より糸球体濾過量を求めた。

糸球体濾過量(mL/min/kg 体重) = 尿中イヌリン濃度(mg/dL) \times 尿量(mL/min) \div 血中イヌリン濃度(mg/dL) \div 体重(kg)

・IV-2-(2). 腎皮質血流量・腎髄質血流量・腎間質圧の測定

麻酔と気道確保については前項と同様である。PE 50 を左大腿動脈に留置し、血圧を測定した。2.0% BSA を生理食塩水に混和し、1.0 mL/100 g 体重/時の流速で左頸静脈より投与した。また、ルート確保を目的として 0.5 mL/h の流速で右大腿静脈より生理食塩水を投与した。また、膀胱にも PE 50 を挿入して尿を排出した。腎臓は皮

膜をはがさないように慎重に露出し、プラスチックのカップに載せて位置を固定した。皮質もしくは髄質の位置に光ファイバーを刺入し、レーザードップラー血流計(オメガフロー, オメガフロー株式会社, 東京, 日本) (図 1G-J)を用いて皮質と髄質のそれぞれの局所血流を測定した。血圧・尿量などが安定するまで 1 時間静置したのちに、血流を 1 時間測定し、ベースライン値とした。その後、左右腎静脈間で中心静脈を血管クリップ(ファインサイエンスツール社 18055-05, ノースヴァンクーバー, カナダ)を用いてクランプし、1 時間血流の測定を続けた。さらに、クランプを外して 30 分間測定を続けた。その後、ポジティブコントロールとして、一酸化窒素合成酵素阻害剤である L-NAME (*N* ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; NG-ニトアルギニンメチルエステル) (6.0 mg/kg 体重/時)を右大腿静脈より 30 分間投与した。L-NAME は、皮質血流には影響せず、髄質血流を低下させるとされており¹⁹⁾、その反応を示さなかった髄質血流測定実験の 1 例については解析から除外した。各実験の後、腎臓を長軸方向に切断し、光ファイバーの刺さっていた部位を確認した。腎間質圧については既報の通り測定した²⁰⁾。手順は血流測定実験と同様であり、光ファイバーの代わりに間質静水圧測定用のカテーテルを腎皮質に挿入した。カテーテルは、PE 50 の先端にフィルターとしてポリエチレンマトリックスを埋め込み、10%ヘパリン含有生理食塩水で満たしたものをを用いた。間質圧は、パワーラブシステムを用いて測定した。

・IV-2-(3). 低酸素についての解析

低酸素の影響を確認するため、Hypoxypote™-1 キット(HP1-100, ヒドロキシプローブ社, バーリントン, マサチューセッツ州)を用い、キットに付属するプロトコールに従った。麻酔下、左右腎静脈間中心静脈結紮術を施行し、その直後にピモニダゾール塩酸塩(Hypoxypote™-1, 60 mg/kg 体重)を腹腔内投与した。2 時間後に両側腎臓を摘出し、皮膜を除去したのちに 3 mm 幅に横断し、10%中性化ホルムアルデヒド(和光純薬株式会社, 大阪, 日本)を用いて固定した。

・IV-3. 左右腎静脈間中心静脈結紮術後の亜急性期の生化学的・分子生物学的解析

亜急性期の実験を行う上で、全てのラットには、麻酔としてケタミン(30 mg/kg 体

重)・キシラジン(2.0 mg/kg 体重)の混合液を筋肉内投与した。腹膜を正中切開し、綿棒を用いて左右腎静脈間中心静脈を慎重に露出し、避けた腸は 37°C に加温した生理食塩水を湿らせたガーゼで覆った。左右腎静脈間中心静脈を 3-0 絹製縫合糸を用いて完全結紮し、腹壁と皮膚を縫合した。解剖学的な腎静脈の位置の異常はみられなかった。術後、感染予防を目的にペニシリン(300,000 U/kg 体重, 筋肉内投与)、鎮痛を目的にブプレノルフィン(0.05 mg/kg 体重, 皮下投与)の投与を行った。そして、ラットが麻酔から覚めるまで、37°C に設定をしたテーブルの上で観察した。疑似手術群には、左右腎静脈間中心静脈結紮の他は同様の手術を行った。

術後 3 日目に、麻酔下に亜急性期の中心静脈圧を測定し、血漿と分腎尿を回収した。麻酔・呼吸については IV-2-(1).と同様である。PE 50 カテーテルを左大腿静脈に挿入し中心静脈圧を測定し、左頸静脈に挿入し補液を行い、左右それぞれの尿管に挿入し尿を回収した(図 2A)。補液には、2.0% BSA を混和した生理食塩水を 1.2 mL/100 g 体重/h で投与した。今回の実験では、左腎からの尿量が少ないことが予想をされたため、他の急性実験と比べて補液を多く行った。中心静脈圧は 30 分間パワーラブシステムで測定をし、分腎尿を 2 時間回収した。血清と尿は長浜ライフサイエンスラボラトリー(長浜, 日本)に提出し、測定を依頼した。

分子生物学的解析には別に用意した検体を用いて行った。術後 3 日目に両側の腎臓を摘出し、皮膜を除去した。組織評価用に 3 mm 幅に横断し、10%中性化ホルムアルデヒドを用いて固定した。残った検体については皮質と髄質に切り分け、遺伝子発現評価用の組織は RNA Later[®](インヴィトロジェン社, カールスバッド, カリフォルニア州)に入れ、-30°C で保存した。タンパク評価用の組織は液体窒素で直ちに凍結して、-80°C で保存した。

腎皮膜除去により腎間質静水圧の上昇が解除することが報告されており²¹⁾、腎間質静水圧を解除する目的で、左腎の皮膜除去(右腎は除去せず)を左右腎静脈間中心静脈結紮術の 5 日前に行った。麻酔下に左腹壁を開腹し腎臓を露出させ、皮膜除去群の左腎皮膜については完全に除去した。その後、腎臓は元の後腹膜腔に戻し、閉腹した。疑似手術群では、皮膜除去の他は同様の手術を行った。

また、マイクロアレイ解析により左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおいてチロシ

ンキナーゼ受容体の一種である PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor; 血小板由来増殖因子受容体)の発現が誘導されていることが確認され、線維化の中心的な役割を担っていることが考えられたため、チロシンキナーゼ受容体阻害剤であるイマチニブメシル酸を投与する実験を行った。投与量は Chen 等の報告に従った²²⁾。水道水にイマチニブメシル酸(東京化成工業株式会社, 東京, 日本)を溶き、50 mg/kg 体重をゾンデを用いて左右腎静脈間中心静脈結紮術を行う前 2 時間と手術後 12 時間毎に経胃投与した。対照群は同量の水道水のみを投与した。術後 3 日目に腎臓を摘出し、解析を行った。

・ IV-4. マイクロアレイ解析

遺伝子発現解析用に保存していた腎臓より、アイソジェン(ニッポンジーン, 東京, 日本)を用いて RNA を抽出した。カラムクロマトグラフィーにより精製したのちに、理研ジェネシス(川崎, 日本)にサンプルを提出し、GeneChip™ Rat Gene 2.0 ST Array (アフィメトリックス社, カルフォルニア)を用いてマイクロアレイとその解析を行った。パスウェイ解析は TAC 4.0 (Transcriptome Analysis Console™ version 4.0 software)(サーモフィッシュャーサイエンティフィック社, ウォルサム, マサチューセッツ州)を用いて行った。

・ IV-5. RNA 発現レベルの解析

2.0 µg の RNA を SuperScript® III 逆転写酵素(インヴィトロジェン)を用いて cDNA に逆転写した。cDNA は、CFX96 Touch™ リアルタイム PCR 解析システム(バイオラド社, ハーキュリーズ, カリフォルニア州)を用いてリアルタイム PCR を行った。目的の cDNA はタカラバイオ社より購入した特異的なプライマー(表 1)を用いて、SYBR® Premix Ex Taq 試薬(タカラバイオ社)により増幅した。mRNA の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素)の発現量を用いて標準化した。

・ IV－6. 組織の解析

ホルムアルデヒドで固定した組織についてのパラフィン包埋、2.0 μm の薄切、エラストイカマッソン染色は東北大学病院病理部に依頼して行った。免疫組織化学染色を行うにあたってキシレンで脱パラフィン化した後に、100%エタノールを用いて親水した。抗原賦活化は 10 mM のクエン酸緩衝液内で電子レンジを用いて 5 分間加熱することにより行った。表 2 にあげた、抗原特異的な抗体を一次抗体として用い、4°C で一晩反応させた。一次抗体の検出にはヒストファインシンプルスステイン MAX PO (ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本)か、Alexa Fluor[®] 488 か Alexa Fluor[®] 555 で蛍光標識された二次抗体(1:500, モレキュラープローブ社, ユージーン, オレゴン州)を用い、37°Cで 30 分間反応させた。その後、免疫染色切片については DAB (3,3'-diaminobenzidine; 四塩酸 3,3'-ジアミノベンジジン) (同仁化学研究所, 熊本, 日本)を用いて発色して、光学顕微鏡(BZ-9000, キーエンス, 東京, 日本)で撮影した。免疫蛍光染色切片については Hoechst[®] 33342 (モレキュラープローブ社)で対比染色をし、TCS-SP8 共焦点顕微鏡(ライカマイクロシステムズ社, ヴェッツラー, ドイツ)を用いて観察した。

・ IV－7. 透過型電子顕微鏡

電子顕微鏡用の組織は 4%パラフォルムアルデヒドによる灌流固定を行い採取した。還流固定後、左右腎静脈中心静脈結紮術後の腎臓を摘出し、組織を 2.0 mm³角に切り出した。透過型電子顕微鏡は既報の通りの手順で行った²³⁾。切り出した組織は 2.5%グルタルアルデヒド・2.0%パラフォルムアルデヒドを混和した 0.2 mol/L のカコシル酸緩衝液(pH 7.4)を用いて固定し、後固定は 1.0%オスミウム四酸化物を混和した 0.08 mol/L のカコシル酸緩衝液に 6.0%スクロースを添加した溶液を用いて行った。エタノールとプロピレンオキシドを用いて脱水した後、エポキシ樹脂(EPON812, DDSA, MNA, DMP-30; TAAB ラボラトリーズ, バークシャー, イギリス)に包埋し、ウルトラミクロトーム(Leica EM UC6, ライカマイクロシステムズ社)を用いて 90 nm の厚さに超薄切した。切片は透過型電子顕微鏡(JEM-1400 電子顕微鏡, 日本電子, 東京, 日本)を用いて観察した。

・ IV-8. 低真空走査型電子顕微鏡

髄質外層の直血管の構造を観察するため、LVSEM (low-voltage scanning electron microscope; 低真空走査型電子顕微鏡) (卓上顕微鏡 Miniscope[®] TM3030, 日立ハイテクノロジーズ, 東京, 日本)を用い、既報の手順に従った²⁴⁾。4.0 μm に薄切した組織を脱パラフィン化し脱水し、Pt-ブルー溶液(TI-ブルーキット, 日新 EM, 東京, 日本)で15分間染色した。蒸留水で洗浄した後、加速電圧15 kV、30 Paの条件で観察した。

・ IV-9. ウェスタンブロッティング

タンパク質解析用に保存していた組織を、1.0 mM フッ化フェニルメチルスルホニル(サーモフィッシュャーサイエンティフィック社)とタンパク質分解酵素阻害剤(ロシュ社, バーゼル, スイス)を混和した放射免疫沈降法バッファー(セルシグナリングテクノロジー社, ダンバース, マサチューセッツ州)の中で氷上10秒間ホモジナイズした。13,800g, 4°C, 10分間の遠心分離の後、上清のタンパク質濃度をブラッドフォード法(バイオラド社)を用いて測定した。レムリーサンプルバッファー(バイオラド)・2.5%メルカプトエタノール混和液の中に20 μg のタンパク質を混和し、95°Cで5分間加熱した。その後、4-20%ミニプロティアン TGX ゲル(バイオラド)を用いて、150 Vの電圧で電気泳動をした。ゲルからトランスブロット Turbo ミニ PVDF 転写メンブレン(バイオラド)へ転写し、PVDF ブロッキング試薬(Can get signal[®]キット, 東洋紡, 大阪, 日本)を用いて1時間ブロッキングをした。ポリソルベート 20 を混和したトリス緩衝生理食塩(TBST, タカラバイオ社)で洗浄したのち、Can Get Signal 溶液1 (東洋紡)で希釈した抗原特異的抗体を用いて4°Cで一晩反応させた。使用抗体、希釈倍率については表2に記載した。一次抗体の検出には、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された二次抗体(1:5,000, サンタクルーズバイオテクノロジー社, ダラス, テキサス)を用い、37°Cで1時間反応させた後、電気化学発光法(サーモフィッシュャーサイエンティフィック社)を用いて化学発光させ、ChemiDoc[™] MP (バイオラド社)を用いて撮影した。各タンパク質の発現レベルは、TUBA (α -tubulin; α -チューブリン

ン)の発現レベルを用いて標準化した。

・ IV－10. 統計解析

結果は、平均±標準誤差で表した。2群間の比較は *t*-検定を行った。多群間の比較には ANOVA (analysis of variance; 分散分析)を用い、事後解析としてチューキー法を用いた。パスウェイ解析には、フィッシャーの正確確率検定を用いた。p 値 0.05 未満を統計学的有意とした。

V. 研究結果

・ V－1. 腎うっ血の急性期血行動態に対する影響

血圧と脈拍数は左右腎静脈間中心静脈結紮後に直ちに減少した後、徐々に改善傾向がみられたが、120 分間の間にベースラインまでは戻らなかった(図 1B, C)。結紮部より上流の下大静脈圧は 20 mmHg 程度まで直ちに上昇し、その値のまま維持された。一方、下流の下大静脈圧は変化しなかった(図 1D)。両腎の尿量と糸球体濾過量は結紮後即座に低下した。非うっ血腎の尿量と糸球体濾過量は徐々に回復し、ベースラインまで改善したが、うっ血側の尿量と糸球体濾過量は観察の間低下したままであった(図 1E, F)。

結紮解除後の血流の改善を評価するため、血管クリップを用いた追加実験を行い、血流測定をした。血管クリップにより両側腎静脈間中心静脈をクランプしたところ、うっ血腎において皮質血流と髄質血流のいずれも低下した。血管クリップを取り除いたところ、速やかにベースラインまで改善した(図 1H, I)。しかし、非うっ血腎において、皮質血流と髄質血流のいずれもわずかに低下する傾向がみられたが、減少の程度はうっ血側に比べて小さかった。腎間質静水圧はうっ血腎において徐々に上昇したが、非うっ血腎では上昇しなかった(図 1J)。腎うっ血による血流の低下に伴い低酸素が起きるか否かについて低酸素となった部位を検出するピモニダゾールを用いて免疫組織化学的に検討した。ピモニダゾールはうっ血側でのみ、主に髄質における下降直血管付近にあるヘンレループ太い上行脚が染色された(図 1K)。

・ V-2. 亜急性期の動物実験

V-2-(1). 生化学的分析

実験の期間中に死亡したラットはいなかった。術後 7 日目には既に側副血行路が著しく発達し、組織学的にもかなり改善してしまっていたため、術後 3 日目の時点で分析をすることにした。術後 3 日目の時点で、結紮群の中心静脈圧は疑似手術群と比較して有意に高値であった(図 2B)。結紮群のうっ血腎の尿量とクレアチニンクリアランスは疑似手術群と比較して有意に少なかった(図 2C, D)。血清クレアチニン濃度と、尿素窒素濃度は結紮群で高値であった(表 3)。クレアチニンクリアランス、尿素窒素、無機リンの排泄は、うっ血腎で低値であった。さらに、クレアチニンで補正したところ、うっ血腎で尿中アルブミン排泄の増加が確認された。

V-2-(2). 形態学的分析

尿細管の拡張と、間質の増生がエラスティカマッソン染色で確認された(図 2E)。糸球体障害の指標となるデスミンの染色強度と、RNA 発現がうっ血腎で亢進していた(図 2F, G)。透過型電子顕微鏡で観察をしたところ、非うっ血腎では糸球体構造は維持をされていたが、うっ血腎では、足突起が消失し、スリット膜が破綻していた(図 2H)。また、集合管においてはミトコンドリアが捕食をされている様子が確認された(図 3)。AQP2(Aquaporin; アクアポリン)の免疫染色を行ったところ、うっ血腎において AQP2 陽性集合管の拡張がみられ、間在細胞の脱落が確認された。(図 4)。

V-2-(3). マイクロアレイ分析

術後 3 日目のラットの皮質と髄質のそれぞれから RNA を抽出し、マイクロアレイ分析を行った。遺伝子オントロジー解析からは、細胞外基質に関わる遺伝子群の増加と、血管収縮調整に関わる遺伝子群の低下がみられた(表 4-7)。特に、細胞外基質増生と尿細管障害マーカーの発現がうっ血腎で増加をしていた(図 5A, B)。これらについては特にリアルタイム PCR でマイクロアレイの発現と同様であるか検証を行った。発現レベルについては差がみられたが、発現パターンは同様であり、うっ血側で非う

っ血側と比較して有意に高値であった。一方で、発現の低下した遺伝子には、DNA アーゼ、カリクレイン、レニン、*Umod*(Uromodulin; ウロモジュリン) などがみられた(図 5C, D)。

マイクロアレイの結果を TAC 4.0 software を用いてパスウェイ解析を行ったところ、焦点接着に関する遺伝子が最も多く増加していた(表 8)。この焦点接着に関するパスウェイの受容体、リガンド、シグナル伝達因子遺伝子(図 5E, 図 6)の内、受容体とリガンドに注目をしたところ、PMT を引き起こす PDGFR の発現が誘導されていた。これらの分子の変化は腎うっ血の病態による変化を反映しているものと考えられた。レニン、アンジオテンシノゲンの遺伝子発現は、皮質において左腎で右腎と比較して低値であった(図 7)。

V-2-(4).皮膜除去による改善

間質静水圧が腎うっ血における腎障害の病因となっているかを検証するため、左腎の皮膜を除去した上で左右腎静脈間中心静脈結紮術を行ったモデル(皮膜除去群)を作製し、疑似手術群と比較した。線維化や、尿細管障害に関与する多くの遺伝子は疑似手術群でも皮膜除去群でもうっ血腎で非うっ血腎と比較して上昇をしていた。しかし、これらの遺伝子は皮膜除去により、皮質でのみ改善していた(図 8A, 図 9A)。一方、我々が検証したほとんどの遺伝子において、髄質では皮膜除去の効果が認められなかった(図 9B, 図 10A)。

ウェスタンブロッティングで PMT に関連する TAGLN (Transgelin; トランスゲリン)、PDGFRA、PDGFRB の発現の誘導は確認され、いずれも皮膜除去により改善していた(図 8B, 10B)。線維化のマーカーとしての FN1 (Fibronectin1; フィブロネクチン)と、尿細管障害のマーカーとしての KIM1 (Kidney injury molecule1; 腎臓傷害分子)もうっ血腎で増加が認められたが、これらに対する皮膜除去の効果は皮質に限定されていた。

免疫組織学的分析でも同様に、PMT に関連する TAGLN、PDGFRA、PDGFRB の染色強度の増強が確認された(図 8C, 10C)。これらは、主にうっ血腎の間質が陽性に染色されており、皮膜除去により改善した。線維化のマーカーである、 α -SMA(α -

Smooth muscle actin; α -平滑筋アクチン)、FN1、VIM (Vimentin; ビメンチン)の陽性領域はうっ血腎の間質において拡大していた。また尿細管障害のマーカーである OPN (Osteopontin; オステオポンチン)、KIM1 はうっ血腎の委縮した尿細管に強く染まり、皮膜除去による改善はリアルタイム PCR の結果と同様に皮質でのみ確認された。

V-2-(5). ペリサイトの脱落

TAGLN、PDGFR は PMT の代表的な遺伝子であるため、それらが直血管周囲のペリサイトや、その周囲の間質に発現をしているかを検証した。その結果、TAGLN、PDGFR はうっ血腎において非うっ血腎と比較してペリサイトとその周囲の間質に強く発現をしていた(図 11A)。LVSEM により、うっ血腎においてペリサイトの脱落と、直血管の拡張が認められた(図 11B)。非うっ血腎では、ペリサイトの脱落は確認されなかった。

V-2-(6). チロシンキナーゼ阻害剤による改善

マイクロアレイの結果から、チロシンキナーゼ受容体の一つである PDGFR の発現が誘導されていることが確認され、これが線維化の中心的な役割を果たしていると考えられたため、チロシンキナーゼ受容体阻害剤のイマチニブメシル酸を用いた実験を行った。皮質・髄質のいずれにおいてもイマチニブメシル酸を投与した群(投与群)において、うっ血側腎の PMT に関連する *Tagln*, *Pdgfra*, *Pdgfrb* の mRNA の発現が低下していた(図 12A, 13A)。また、この改善効果は、免疫染色でも皮質において特に顕著であった(図 12B, 13B)。一方、*Kim1* の mRNA 発現レベル、免疫染色所見は対照群と投与群で差はみられなかった。

V-2-(7). 術後3日目と術後7日目の比較

術後3日目に見られていたうっ血腎における *Fln1*, *Acta2* の発現の亢進については、術後7日目には改善がみられた。*Lcn2* (Lipocalin2; リポカリン)については有意な変化は見られなかった。(図 14)

VI. 考察

今回、我々は、左右腎静脈間中心静脈結紮によるラットの新しい腎うっ血モデルを作製した。少数ではあるが、これまでに両側腎静脈の下流で中心静脈の結紮を行った腎うっ血モデルについて報告がなされている^{11,25)}。しかし、我々の知る限りでは左右腎静脈間中心静脈結紮したモデルについての報告はこれまでにない。さらに我々はこの新しいモデルに対して生理学的・組織学的・分子学的解析を行い、腎うっ血において腎障害の生じる機序について解明した。左右腎静脈間中心静脈の結紮に伴い、急性期に中心静脈圧の増加と、糸球体濾過量、尿量、腎血流の低下が確認された。亜急性期においても結紮群の中心静脈圧は高値であった。亜急性期においてクレアチニンクリアランスと尿量はうっ血腎で非うっ血腎と比較して少なかった。分子生物学的・組織学的分析の結果、腎うっ血による腎障害の原因に PMT が関係していることが示唆された。我々は、腎うっ血によるペリサイトの脱落が腎線維化の引き金となっているという新たな腎線維化の病因を見出した。

VI-1. 腎うっ血の新規ラットモデル

近年、中心静脈圧の上昇と腎障害の進行には強い因果関係があるとして注目されている²⁾。しかし、その機序は十分に明らかになってはいない。中心静脈の結紮は、中心静脈圧を上昇させるうえで最も簡便な方法である。しかし、中心静脈を両側腎静脈の上で結紮するモデルは重篤であり、時に致死적である²⁶⁾。このモデルでは両側腎機能の低下により、高カリウム血症や低ナトリウム血症を引き起こされる¹¹⁾ことが、致死的原因であると考えられる。我々のモデルでは、非うっ血側腎臓の糸球体濾過量は1時間以内に回復し、非うっ血側のクレアチニンクリアランスや組織学的変化は術後3日目に疑似手術群と比較して差はみられなかった。従って、腎機能の低下による致死的な障害は起きえなかったものと考えられる。実際、本研究の観察期間内に死に至る、または人道的中断を要するようなラットはみられなかった。さらに、この

モデルは、同一個体内でうっ血側と非うっ血側の比較が可能であることが長所である。これにより、遺伝的な背景や全身の血圧や血管作動物質などの腎障害に影響を与えうる他の条件は同じ状況の下、腎うっ血が腎臓に与える影響を比較できる。

VI-2. 腎うっ血における腎血流と間質静水圧

皮質血流と髄質血流の低下が左右腎静脈間中心静脈結紮後のうっ血腎において認められた。腎静脈圧は、中心静脈圧の上昇に伴い上昇する。これまでに、腎静脈圧が上昇することで腎血流が低下することが報告されており^{7, 27)}、我々の結果はこれらの報告を支持するものである。イヌにおいて、腎静脈圧が 18-20 mmHg に達するまでは腎血流は標準に保たれ、腎機能は安定であると報告されている²⁸⁾。我々のラットのモデルでは、腎静脈圧を直接測定することは困難であるため、各腎静脈のレベルの中心静脈圧を測定し、腎静脈圧の代用とした。中心静脈結紮後にその上流では静脈圧が 20 mmHg 程度まで上昇し、この際にうっ血側の腎血流の低下が確認された。我々の結果は、これまでの報告と同様に中心静脈圧の上昇につれて腎静脈圧が上昇し、それにより腎血流が低下したということを示唆している。また、皮質血流と髄質血流は結紮の直後に低下した一方で、間質静水圧は徐々に増加した。当初、我々は間質静水圧の上昇が腎血流の低下を引き起こすと予想していたが、この結果からは腎内局所血流の低下には別の要因が関係していることが示唆される。尿細管周囲毛細血管圧は腎静脈圧が上昇することにより上昇するため、局所血流は下流の圧が上昇することにより低下したと考えられる。一方、この条件下では糸球体内圧も上昇することが予想される。糸球体内圧が上昇すると、糸球体濾過量が上昇することが予想されるが、我々の結果は逆に糸球体濾過量は低下していた。間質圧の上昇とともに、尿細管が圧縮されるため、それが糸球体濾過量の低下を引き起こしたと考えられる⁴⁾。

腎血流の低下に伴い、組織低酸素が確認されたが、これは、直血管周囲の組織に局限をしていた。ヘンレループを囲む直血管束においては、動静脈が並走しており、動脈血中の酸素が静脈血に奪われてしまい、またヘンレループの太い上行脚で酸素を使ってナトリウムの能動輸送をしているために周囲よりも元々低酸素であり、かつ、酸素を利用する部位であることがこの結果に表れたと考えられる^{29, 30)}。

VI-3. 腎うっ血における分子的な変化

マイクロアレイ解析で腎うっ血に伴い発現の亢進していた遺伝子は、主に細胞外基質に関連する遺伝子と、尿細管障害のマーカーであった。これらは腎うっ血における腎障害の原因というよりむしろ結果である。これらの遺伝子は原因でないとしても、RNA のみでなく、タンパク質の発現量も増加していたため、現在まだマーカーとして確立されたものが存在しない腎うっ血のマーカーとなりうる可能性がある。我々のモデルで最も発現の亢進していたのは KIM1 であるが、これは、うっ血性心不全下で腎障害が進行する際の強力な予後予測因子であると考えられている³¹⁾。しかし、KIM1 の発現はどのような腎障害であっても上昇する。今回マイクロアレイ解析で遺伝子発現の亢進が認められた上位の遺伝子について、いずれも腎うっ血のマーカーの候補となりうるため、どれが腎うっ血のマーカーとして最も特異的で効果的な分子であるか決定するには臨床研究を含めた更なる研究が必要である。

パスウェイ解析では図 5E に挙げるように細胞外基質受容体、チロシンキナーゼ受容体、インテグリンを含む焦点接着に関する遺伝子がうっ血腎で亢進していた。焦点接着は細胞増殖を引き起こし、腎臓線維化における主要な因子であると考えられている³²⁾。PDGFR はチロシンキナーゼ受容体の一つであり、腎臓において PMT を引き起こすと報告されている²²⁾。顕微鏡での観察とあわせて、物理的刺激によってペリサイトが脱落し、PDGFR の発現を誘導したことが、本研究における細胞外基質増生の主要な要因であると考えられる。

VI-5. 皮膜除去による改善効果

皮膜除去による腎臓への影響は二種類の機序が報告されている。一つは間質静水圧上昇の抑制^{20,33)}、もう一つは腎組織虚血の改善である³⁴⁾。我々のモデルでは、尿細管間質障害は皮膜除去により改善したため、腎うっ血の尿細管間質障害に間質静水圧が関与していることが考えられる。これは、物理的刺激により線維化が進行するという既報³⁵⁾にも合致する。皮膜除去により総腎血流は変化しないとされている³⁶⁾が、低酸素は微小循環の回復により改善する可能性もある。皮膜除去により尿細管障害の程度

や、多くの線維化マーカーについては皮質でのみ改善していたのに対し、PMT に関連するタンパク質である PDGFR や TAGLN は主に髓質で改善していた。皮質と髓質で異なる結果となったのは、間質静水圧への反応が皮質と髓質で異なることに起因すると考えられる。実際、皮膜除去により皮質では間質静水圧が改善する一方で、髓質では皮膜除去による間質静水圧の改善効果はみられないとする報告もある²⁰⁾。

VI-6. 腎うっ血における尿細管障害

我々の左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおける尿細管障害の機序として、いくつかの要因が考えられる。一つ目として、腎血流が低下するために糸球体濾過量と尿流が低下するということがあげられる。尿流は一次繊毛に由来するオートファジーを引き起こし、腎臓における尿細管上皮細胞の恒常性の維持に必要である³⁷⁾。我々のうっ血モデルにおいて尿流は術後3日の段階でも改善をしておらず、これにより尿細管細胞のターンオーバーが不十分となり、尿細管障害が引き起こされたと考えられる。また、腎血流の低下は尿細管の低酸素を引き起こす。特に酸素消費の多い近位尿細管と髓質のヘンレループ太い上行脚では影響を受けやすい。二つ目として、*Umod*発現の低下が尿細管障害を引き起こしうる。*Umod*の働きについては明確になっていないが、*Umod*に変異があると間質障害が引き起こされる³⁸⁾。また、*Umod*欠損マウスを用いた研究において、*Umod*は尿細管上皮の輸送を制御していることが報告されている³⁹⁾。我々の左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおいてもうっ血側で *Umod* の低下が確認され、これが尿細管障害の原因となっていた可能性がある。三つ目として、間質静水圧の増加が尿細管を圧縮し、尿細管障害を引き起こした可能性がある⁴⁰⁾。また、うっ血腎において AQP2 陽性集合管の拡張がみられた。この現象は虚血再灌流モデルでも確認がされており虚血により集合管の間在細胞が脱落することで内腔が拡大したものと考えられている⁴¹⁾。ただ、この機序についてはまだ明らかにはなっていない。本研究では皮膜除去により尿細管障害が改善したが、皮膜除去により間質静水圧が解除されることで、尿細管の圧縮が解除され、尿細管障害が改善したものと考えられる。

VI-7. 腎うっ血における足細胞障害

我々の左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおいて、足細胞障害とスリット膜構造の破綻が確認された。また、その結果としてアルブミン尿がみられた。アルブミン尿はうっ血性心不全の患者においてもみられると報告されている⁴²⁾。Rafiq 等は大動脈狭窄による心容量負荷モデルにおいて足細胞障害とアルブミン尿がみられ、これに腎内のアンジオテンシン II の過剰発現が関与していることを報告している⁴³⁾。しかし、我々のモデルにおいてはレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の活性化は認められなかった。ただ、本研究では腎組織をホモジナイズしたサンプルにつき PCR を行っており、腎内の局所レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系についての評価はできておらず、この糸球体障害へのレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の関与について否定することはできず、今後の検討が必要である。足細胞障害の原因についてはまだ確立されていないが、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の他にも毒物や血管内圧の上昇によっても引き起こされるとされており^{44,45)}、本研究においても血管内圧の急激な上昇が足細胞障害の原因となった可能性がある。さらに、糸球体で濾過されたアルブミンは近位尿細管で多くが再吸収される⁴⁶⁾が、近位尿細管障害も見られる本モデルのうっ血腎では尿中にアルブミンが顕在化したものと考えられる。

VI-8. 腎うっ血における間質障害の機序

我々はうっ血腎において下降直血管内腔の拡張を確認した。また、内腔の拡張している直血管においてペリサイトの脱落がみられ、その周囲で細胞外マトリックスの拡大がみられた。この結果から、我々はペリサイトの脱落が線維化を引き起こしたと考えた。脱落したペリサイトは PMT により筋線維芽細胞へと分化転換し増殖することで線維化を引き起こすと考えられている¹⁶⁾。ペリサイトは、下降直血管の周りを囲み、収縮を調整して腎髄質の血行動態を調整している⁴⁷⁾。従って、ペリサイトの脱落により髄質の血行動態が変化すると考えられ、そのために周囲の組織が低酸素となったと考えられる。ペリサイトはストレス下で脱落するとされている⁴⁸⁾が、その機序については解明されていない。本研究におけるストレスは、低酸素、活性酸素、間質静水圧、毛細血管内圧の上昇などが考えられ、これらが複合的に影響しペリサイトの脱落を引

き起こした可能性が示唆される。我々は、その中でも低酸素がペリサイトの脱落に重要な役割を果たしたと考えている。ピモニダゾールはうっ血側腎髄質のヘンレループの太い上行脚で陽性に染色されたが、ペリサイトは染色されなかった。Mori 等は活性酸素がヘンレループの太い上行脚からペリサイトへと拡散されることを報告している⁴⁹⁾。このことから、うっ血腎における低酸素がヘンレループの太い上行脚における活性酸素の産生を引き起こし、それがペリサイトの脱落を引き起こしたという可能性が考えられる。

PDGF パスウェイは、PMT の代表的なパスウェイと考えられている^{16,50)}。PDGFR の誘導はマウスの尿管結紮モデルや虚血再灌流モデルでも見られ、これらのモデルにおける線維化の原因の一つと考えられている²²⁾。本研究において、我々は直血管周囲の PDGFR の発現を確認しており、これは PMT が引き起こされていることを示唆している。また、PDGFR を阻害することにより PMT 関連タンパクが改善することが本研究でも確認されたが、KIM1 は改善しなかった。尿細管の障害については PMT の関与よりも間質静水圧による圧迫などの他の要因の影響が大きいことを示唆する所見であると考えられるが、イマチニブが間質静水圧にどのような影響をあたえるのかについては今後の検討が必要である。

直血管の拡大が今回のモデルで確認をされたが、腎灌流圧上昇モデルのような、間質静水圧が上がるモデルでは直血管の拡張はおこらないとされている²¹⁾。その一方で、ペリサイトの脱落は直血管の拡張を引き起こすとされている⁵¹⁾。本研究において直血管の拡張がみられたのも、ペリサイトの脱落が先行しその結果として直血管が拡張したと考えられるが、直血管の拡張が先に起きて物理的にペリサイトが剥離したという可能性についても否定はできない。以上より、ペリサイトが腎うっ血の病態生理において重要な役割を果たしていると考えられる。

VI-9. ペリサイト筋線維芽細胞転換

PMT に関わるパスウェイはいくつか報告されているが、代表的なものは TGF- β パスウェイと PDGF パスウェイである⁵²⁾。TGF- β パスウェイについては、本研究のパスウェイ解析でも上位にみられ、TGF- β 遺伝子発現の誘導も見られている。また、

TGF- β パスウェイはイマチニブで阻害されることも報告されており⁵³⁾、このパスウェイが本モデルにおいて PMT に関与した可能性は考えられる。PDGFR の発現誘導がみられ、本研究では PDGF パスウェイに着目をしたが、PDGF の発現自体はむしろ低下していた。TGF- β が PDGFR を刺激するという報告もあり⁵⁴⁾、本研究の結果もこの影響である可能性があり、今後 PDGFR により選択的な阻害剤や、TGF- β 阻害剤等を用いてどのパスウェイが腎うっ血の線維化により影響を与えているのか、検討をしていきたい。

VI-10. 現行治療法についての考察

本研究における左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおける腎うっ血は右心不全優位の急性心不全下における腎臓の状態に近いと考えられる。本邦においてこの病態における治療法は、利尿薬が中心である⁵⁵⁾。本研究では中心静脈圧の上昇自体が腎障害を引き起こす原因となっていることを示した。そこで、体液を適切に管理し、中心静脈圧の上昇を防ぐ治療が腎うっ血に対して有効であると考えられ、そのためには利尿薬が必要であるが、実臨床ではフロセミドや限外濾過による体液量調整で中心静脈圧が低下しうっ血が解除される症例は 10%程度と低く⁵⁶⁾、十分に有効であるとは言い難い状況にある。

硝酸薬は静脈拡張により肺動脈圧と中心静脈圧をともに下げる効果が示されている⁵⁷⁾。左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおける中心静脈圧の上昇時には既に結紮部より上流の静脈は拡張していると考えられるが、硝酸薬によりさらに末梢の静脈も含めて拡張をし中心静脈圧を低下できる可能性はあり、今後検討をしたい。

レニン・アンジオテンシン系の阻害剤については、降圧効果の他に、輸出細動脈の拡張に伴う糸球体内圧抑制⁵⁸⁾による長期の腎保護効果がある薬剤として広く用いられている。また、腎血管抵抗を低下させ、腎血流を増加させる効果がある。尿管結紮モデルにおいてもその効果は確認されているが、尿管結紮モデルではその GFR の改善効果についてはみられていない⁵⁹⁾。左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおいてレニン・アンジオテンシン系の阻害剤の使用は尿管結紮モデルと同様に、腎血流の改善効果はあると考えられるが、腎間質圧上昇に伴う尿細管・微小血管の圧縮があると考え

られるため、糸球体内圧や GFR の改善については効果が期待できないと考えられる。

VI-11. 研究限界と今後の展望

このモデルにおいては早期から側副血行路が発達してしまい、術後 3 日目にみられた障害は 1 週間でかなり改善してしまう。静脈結紮における側副血行路の発達という報告はこれまでも数多くなされている^{60,61)}。中心静脈圧は急性実験の際には結紮直後に 20 mmHg 程度まで上昇したが、3 日後には既に 10 mmHg まで低下していた。従って、このモデルは長期間の観察には向かないかもしれない。

また、左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおいては心臓と右腎臓の機能はほぼ正常であると考えられ、実際のうっ血性心不全とは神経内分泌系の働きという点では異なると考えられる。しかし、一方で神経内分泌系の働きを考慮せずに腎うっ血の影響を直接的に評価できるという点で利点ともなりうると考えている。ただ、結紮後急性期の血圧・脈拍は大きく低下しており、これが両腎に影響を及ぼす可能性についてはこのモデルを実験に用いるにあたり常に念頭に置く必要がある。

マイクロアレイとその結果を用いたパスウェイ解析の結果から、うっ血腎におけるミトコンドリアの電子輸送連鎖パスウェイに存在するほとんど全ての遺伝子が抑制をされていた。また、うっ血腎においてミトコンドリアが捕食されていることが電子顕微鏡観察により確認された。これらの結果はミトコンドリアの障害がこのモデルの病態生理に関係している可能性があることを意味していると考えられるが、その役割については更なる研究が必要であると考えられる。

VII. 結論

図 15 のように、中心静脈圧の上昇は腎血流を低下させ、それと同時に間質静水圧を上昇させる。それに伴い毛細血管や尿細管は圧縮され、低酸素や直血管内腔圧の上昇に伴う物理的刺激によりペリサイトが脱落し、足細胞障害が引き起こされる。それは細胞外基質の増生と尿細管障害を引き起こす。以上のような機序により、腎うっ血時に腎機能の低下が進行するものと考えられる。

VIII. 謝辞

本論文を作成するにあたり指導教官の腎・高血圧・内分泌学分野教授 伊藤貞嘉先生から、丁寧なご指導を賜りました。深く御礼申し上げます。

本稿を御査読賜りました分子病態治療学分野教授 宮田敏男先生、分子内分泌学分野教授 菅原明先生、血液・免疫病学分野准教授 藤井博司先生、酸素医学分野准教授 鈴木教郎先生に深く感謝申し上げます。

実験の実施から論文作成までの全ての段階において、東北医科薬科大学教授 森建文先生、講師 衣笠哲史先生、博士研究員 廣瀬卓男先生に熱心にご指導を賜りました。また、臨床薬学分野教授 佐藤博先生、助教 佐藤恵美子先生、統合腎不全医療寄付講座助教 大崎雄介先生に的確なご助言を賜りました。実験を実施するにあたり、腎・高血圧・内分泌学分野 高橋知香さん、金須清美さんの協力を賜りました。また、実験動物の管理、実験サンプルの作製、実験機器の利用に際し東北大学動物実験センター、東北大学病院共同実験室、東北大学病院病理部、加齢医学研究所共通機器管理室に協力を賜りました。皆様に深く感謝申し上げます。

IX. 文献

1. Maxwell MH, Breed ES and Schwartz IL. Renal venous pressure in chronic congestive heart failure. *J Clin Invest.* 1950;29:342-348.
2. Mullens W, Abrahams Z, Francis GS, et al. Importance of venous congestion for worsening of renal function in advanced decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:589-596.
3. Damman K, van Deursen VM, Navis G, et al. Increased central venous pressure is associated with impaired renal function and mortality in a broad spectrum of patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:582-588.
4. Ross EA. Congestive renal failure: the pathophysiology and treatment of renal venous hypertension. *J Card Fail.* 2012;18:930-938.
5. Guazzi M, Gatto P, Giusti G, et al. Pathophysiology of cardiorenal syndrome in decompensated heart failure: role of lung–right heart–kidney interaction. *Int J Cardiol.* 2013;169:379-384.
6. Burnett Jr J and Knox F. Renal interstitial pressure and sodium excretion during renal vein constriction. *Am J Physiol.* 1980;238:F279-F282.
7. Doty JM, Saggi BH, Sugerman HJ, et al. Effect of increased renal venous pressure on renal function. *J Trauma.* 1999;47:1000-1003.
8. Burnett Jr J, Haas J and Knox F. Segmental analysis of sodium reabsorption during renal vein constriction. *Am J Physiol.* 1982;243:F19-F22.
9. Stamler J, Goldberg H, Gordon A, et al. Relationship of elevated renal venous pressure to sodium clearances and edema formation in unanesthetized dogs. *Am J Physiol.* 1951;166:400-407.
10. Wear Jr J. Ligation of the inferior vena cava above the renal veins. *J Urol.* 1961;86:301-303.
11. Wald H and Popovtzer MM. Renal function and Na– K-ATPase in rats after suprarenal ligation of inferior vena cava. *Pflugers Arch.* 1982;394:165-173.

12. Morsing P, Stenberg A, Müller-Suur C, et al. Tubuloglomerular feedback in animals with unilateral, partial ureteral occlusion. *Kidney Int.* 1987;32:212-218.
13. Jin C, Hu C, Polichnowski A, et al. Effects of renal perfusion pressure on renal medullary hydrogen peroxide and nitric oxide production. *Hypertension.* 2009;53:1048-1053.
14. Mori T, Polichnowski A, Glocka P, et al. High perfusion pressure accelerates renal injury in salt-sensitive hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:1472-1482..
15. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2007;117:3810-3820.
16. Campanholle G, Ligresti G, Gharib SA, et al. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;304:C591-C603.
17. Zeisberg M and Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;304:C216-C225.
18. Lorenz JN and Gruenstein E. A simple, nonradioactive method for evaluating single-nephron filtration rate using FITC-inulin. *Am J Physiol.* 1999;276:F172-F177.
19. Cowley AW, Mori T, Mattson D, et al. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R1355-R1369.
20. Garcia-Estan J and Roman RJ. Role of renal interstitial hydrostatic pressure in the pressure diuresis response. *Am J Physiol.* 1989;256:F63-F70.
21. Farrugia E, Lockhart JC and Larson TS. Relation between vasa recta blood flow and renal interstitial hydrostatic pressure during pressure natriuresis. *Circ Res.* 1992;71:1153-1158.
22. Chen Y-T, Chang F-C, Wu C-F, et al. Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte–myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. *Kidney Int.* 2011;80:1170-1181.
23. Aoki S, Saito-Hakoda A, Yoshikawa T, et al. The reduction of heparan sulphate in the glomerular basement membrane does not augment urinary albumin excretion. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;33:26-33.
24. Inaga S, Hirashima S, Tanaka K, et al. Low vacuum scanning electron microscopy for

paraffin sections utilizing the differential stainability of cells and tissues with platinum blue. *Arch Histol Cytol.* 2009;72:101-106.

25. Du Rietz B, Ekman R and Olsson AM. Vascular lesions in the rat after ligation of the inferior vena cava above the renal veins. *Urol Res.* 1979;7:253-260.

26. Arpayoglou A and Cassanello dAB. Interruption of the inferior vena cava above and between the renal veins. *J Ark Med Soc.* 1988;84:489-492.

27. Tomomatsu T, Ino T, Matsumoto E, et al. Studies on Renal Functions During Venous Occlusion: Part I. Immediate Effect of Venous Occlusion. *Jpn Circ J.* 1963;27:437-442.

28. Wencker D. Acute cardio-renal syndrome: progression from congestive heart failure to congestive kidney failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2007;4:134-138.

29. Brezis M and Rosen S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. *N Engl J Med.* 1995 Mar 9;332(10):647-655.

30. Shimada S and Ito S. Cardio-renal connection and SGLT2 inhibitors. *Cardioangiology.* 2017;82:351-357.

31. Damman K, Masson S, Hillege HL, et al. Tubular damage and worsening renal function in chronic heart failure. *JACC Heart Fail.* 2013;1:417-424.

32. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7:684-696.

33. Abildgaard U, Amtorp O, Agerskov K, et al. Renal vascular adjustments to partial renal venous obstruction in dog kidney. *Circ Res.* 1987;61:194-202.

34. Cruces P, Lillo P, Salas C, et al. Renal Decapsulation Prevents Intrinsic Renal Compartment Syndrome in Ischemia-Reperfusion–Induced Acute Kidney Injury: A Physiologic Approach. *Crit Care Med.* 2018;46:216-222.

35. Sato M, Muragaki Y, Saika S, et al. Targeted disruption of TGF- β 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest.* 2003;112:1486-1494.

36. Stothert Jr JC. Renal blood flow and intrarenal distribution of blood flow after decapsulation in the postischemic kidney. *Ann Surg.* 1980;191:456-459.

37. Orhon I, Dupont N, Zaidan M, et al. Primary-cilium-dependent autophagy controls epithelial cell volume in response to fluid flow. *Nat Cell Biol.* 2016;18:657-667.
38. Bleyer AJ, Živná M and Kmoch S. Uromodulin-associated kidney disease. *Nephron Clin Pract.* 2011;118:c31-c36.
39. Bachmann S, Mutig K, Bates J, et al. Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F559-F567.
40. Mori T, Ohsaki Y, Oba-Yabana I, et al. Diuretic usage for protection against end-organ damage in liver cirrhosis and heart failure. *Hepatol Res.* 2017;47:11-22.
41. Han K-H, Kim H-Y, Croker BP, et al. Effects of ischemia-reperfusion injury on renal ammonia metabolism and the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F1342-F1354.
42. Figueiredo EL, Leão FV, Oliveira LV, et al. Microalbuminuria in nondiabetic and nonhypertensive systolic heart failure patients. *Congest Heart Fail.* 2008;14:234-238.
43. Rafiq K, Noma T, Fujisawa Y, et al. Renal Sympathetic Denervation Suppresses De Novo Podocyte Injury and Albuminuria in Rats With Aortic RegurgitationClinical Perspective. *Circulation.* 2012;125:1402-1413.
44. Kriz W, Shirato I, Nagata M, et al. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304:F333-F347.
45. Endlich N and Endlich K. The challenge and response of podocytes to glomerular hypertension. *Semin Nephrol.* 2012;32:327-341.
46. Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, et al. Increase of total nephron albumin filtration and reabsorption in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Jan;28(1):278-289.
47. Cowley AW, Mori T, Mattson D, et al. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R1355-R1369.
48. Schrimpf C, Teebken OE, Wilhelmi M, et al. The role of pericyte detachment in vascular rarefaction. *J Vasc Res.* 2014;51:247-258.
49. Mori T, O'Connor PM, Abe M, et al. Enhanced superoxide production in renal outer medulla of Dahl salt-sensitive rats reduces nitric oxide tubular-vascular cross-talk. *Hypertension.*

2007;49:1336-1341.

50. LeBleu VS, Taduri G, O'connell J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*. 2013;19:1047-1053.

51. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, et al. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. 2006;443:700-704.

52. Wang N, Deng Y, Liu A, et al. Novel Mechanism of the Pericyte-Myofibroblast Transition in Renal Interstitial Fibrosis: Core Fucosylation Regulation. *Sci Rep*. 2017;7:16914.

53. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, et al. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF- β pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J*. 2005;19:1-11.

54. Tomasovic A, Kurrle N, Wempe F, et al. Ltbp4 regulates Pdgfr β expression via TGF β -dependent modulation of Nrf2 transcription factor function. *Matrix Biol*. 2017;59:109-120.

55. Group JJW. Guidelines for treatment of acute heart failure (JCS 2011). *Circ J*. 2013;77:2157-2201.

56. Bart BA, Goldsmith SR, Lee KL, et al. Ultrafiltration in decompensated heart failure with cardiorenal syndrome. *N Engl J Med*. 2012;367:2296-2304.

57. Tremblay J-A, Couture ÉJ, Albert M, et al. Noninvasive administration of Inhaled nitric oxide and its hemodynamic effects in patients with acute right ventricular dysfunction. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2018 Aug 8.

58. Ter Wee P, Forster H and Epstein M. Video-microscopic assessment of the role of tissue angiotensin-converting enzyme in the control of the renal microcirculation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281:434-439.

59. Hvistendahl JJ, Pedersen TS, Djurhuus JC, et al. Losartan attenuates renal vasoconstriction in response to acute unilateral ureteral occlusion in pigs. *Urol Res*. 2002 Jul;30(3):169-177.

60. Threefoot SA, Cabrera-Gil C and Pearson JE. Collateral circulation, renal function and histology after experimental obstruction of renal veins. *Chest*. 1970;58:249-260.

61. Robinson LS. The collateral circulation following ligation of the inferior vena cava. *Surgery*. 1949;25:329-347.

X. 図

図1

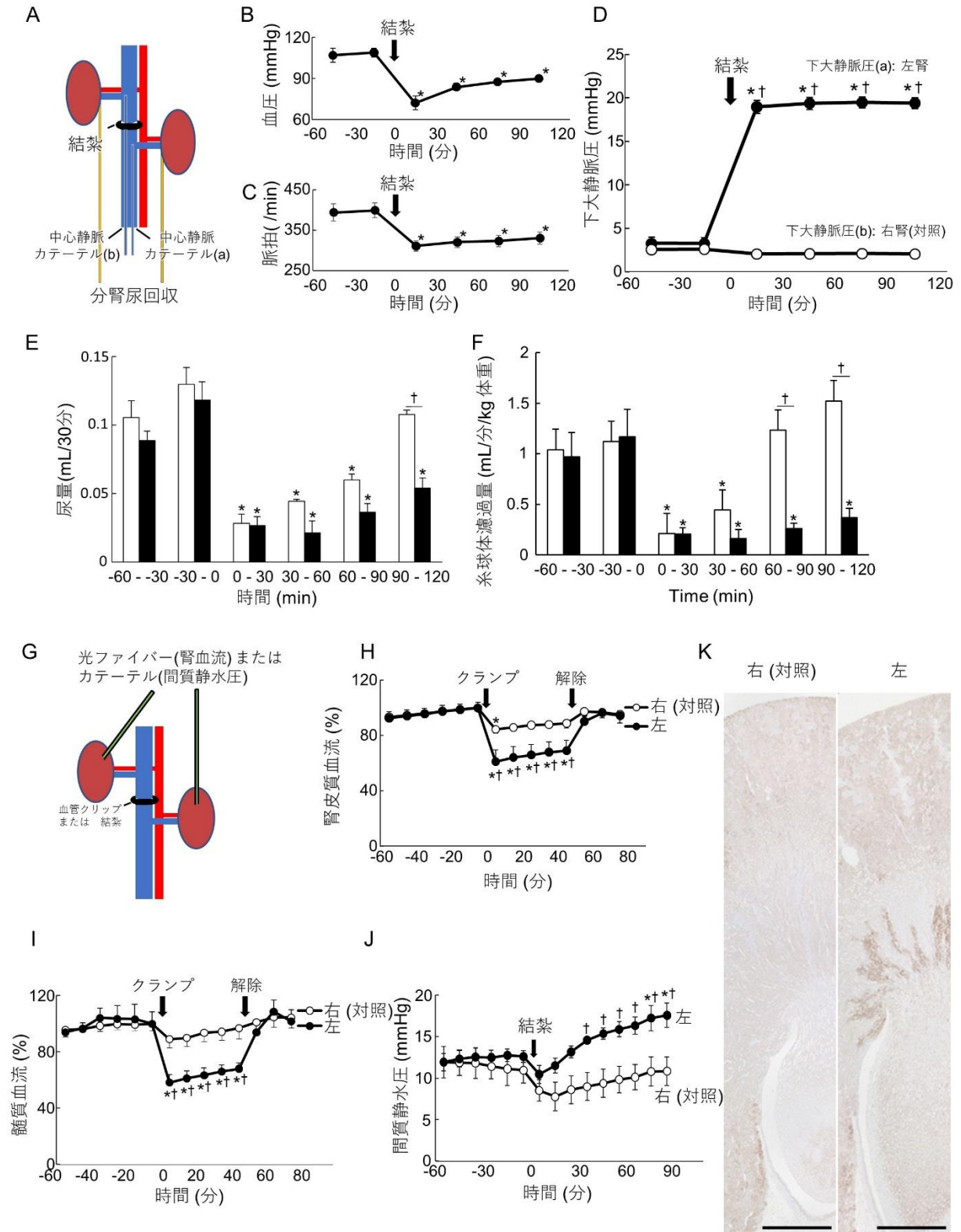


図 1 急性期腎血行動態の変化

(A) 糸球体濾過量・中心静脈圧測定についての急性期動物実験の模式図を示した。中心静脈圧を測定するためにカテーテルを各腎静脈分岐部に留置し、両側尿管にもそれぞれカテーテルを挿入し分腎尿を回収した。60 分のベースライン値測定後に時間 0 の点で結紮を行った。(B) 血圧, (C) 脈拍, (D) 中心静脈圧, (E) 尿量, (F) 糸球体濾過量を各実験において同時に測定した。n=5。□右(対照)、■左。(G) 腎血流測定・間質静水圧測定についての急性期動物実験の模式図。血流測定にあたっては光ファイバーを腎皮質または腎髄質に挿入し、各領域における腎血流を測定した。間質静水圧測定にあたっては間質圧測定用のカテーテルを皮質に挿入した。クランプまたは結紮を 60 分のベースライン値測定後に時間 0 の点で行った。クランプは 50 分後に解除した。(H)皮質血流、(I)髄質血流、(J)間質静水圧は別々に測定した。n=4-5。○ 右(対照)、●左。データは 10 分毎の平均±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ 対ベースライン値 (-10 分から 0 分)、† $p < 0.05$ 対右。チューキー検定。(K)ピモニダゾール染色により組織低酸素の検討を行った。スケールバー 1.0 mm。

右(対照): 非うっ血右腎臓、左: うっ血左腎臓。

図2

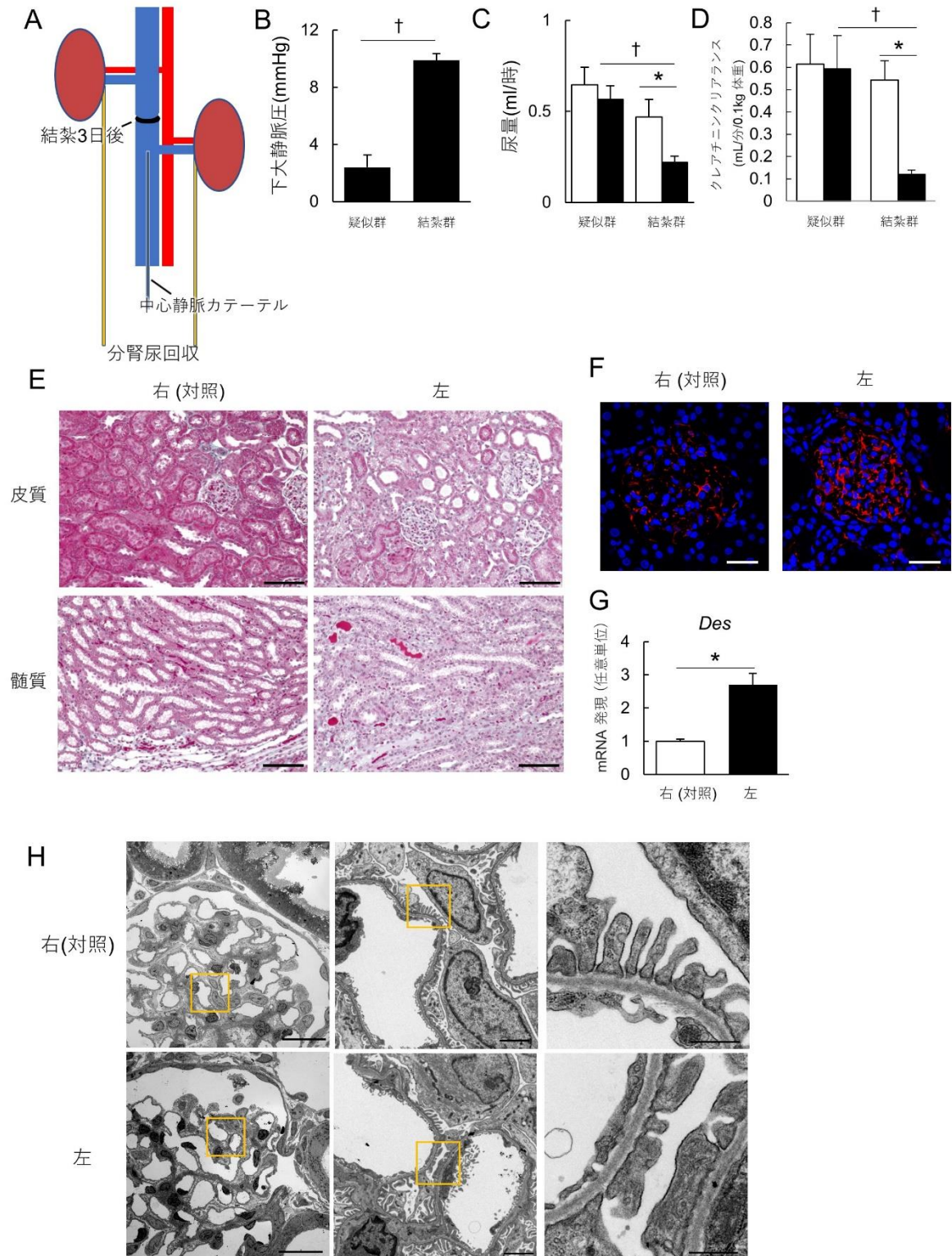


図2 亜急性期の生化学的・組織化学的検討

(A) 亜急性期生化学実験の模式図を示した。中心静脈カテーテルを挿入し、中心静脈圧を測定した。また、両側尿管にそれぞれカテーテルを挿入し、分腎尿を回収した。(B) 疑似群、結紮群それぞれの下大静脈圧を測定した。 $\dagger p < 0.05$ 対疑似群。(C) 尿量と(D) クレアチニンクリアランスを示した。 $n=4-6$ 。データは平均+標準誤差で示した。 $*p < 0.05$ 対右(対照)、 $\dagger p < 0.05$ 対疑似群。チューキー検定。(C)と(D)において□右(対照)、■左。(E) 亜急性期における腎組織標本のエラスティカマッソン染色を示した。スケールバー 100 μm 。(F) DESの蛍光免疫染色所見を示した。スケールバー 25 μm 。(G) *Des*のmRNA発現レベルを示した。結果は右(対照)と左で比較した。 $n=5-7$ 。データは平均+標準誤差で示した。 $*p < 0.05$ 対右(対照)。 t -検定。(H)透過型電子顕微鏡による観察所見を示した。スケールバー左から 20 μm 、2 μm 、500 nm。

DES: (Desmin: デスミン)、右(対照): 非うっ血右腎臓、左: うっ血左腎臓、疑似群: 疑似手術群、結紮群: 左右腎静脈間中心静脈結紮手術群。

図3

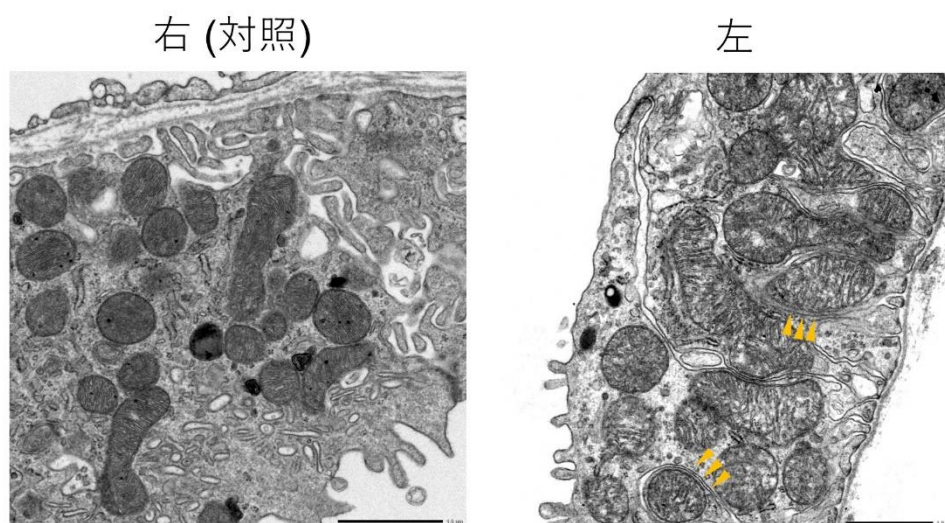


図3 集合管の電子顕微鏡像

矢頭はミトコンドリアを示す。スケールバー 1.0 μm 。

図4

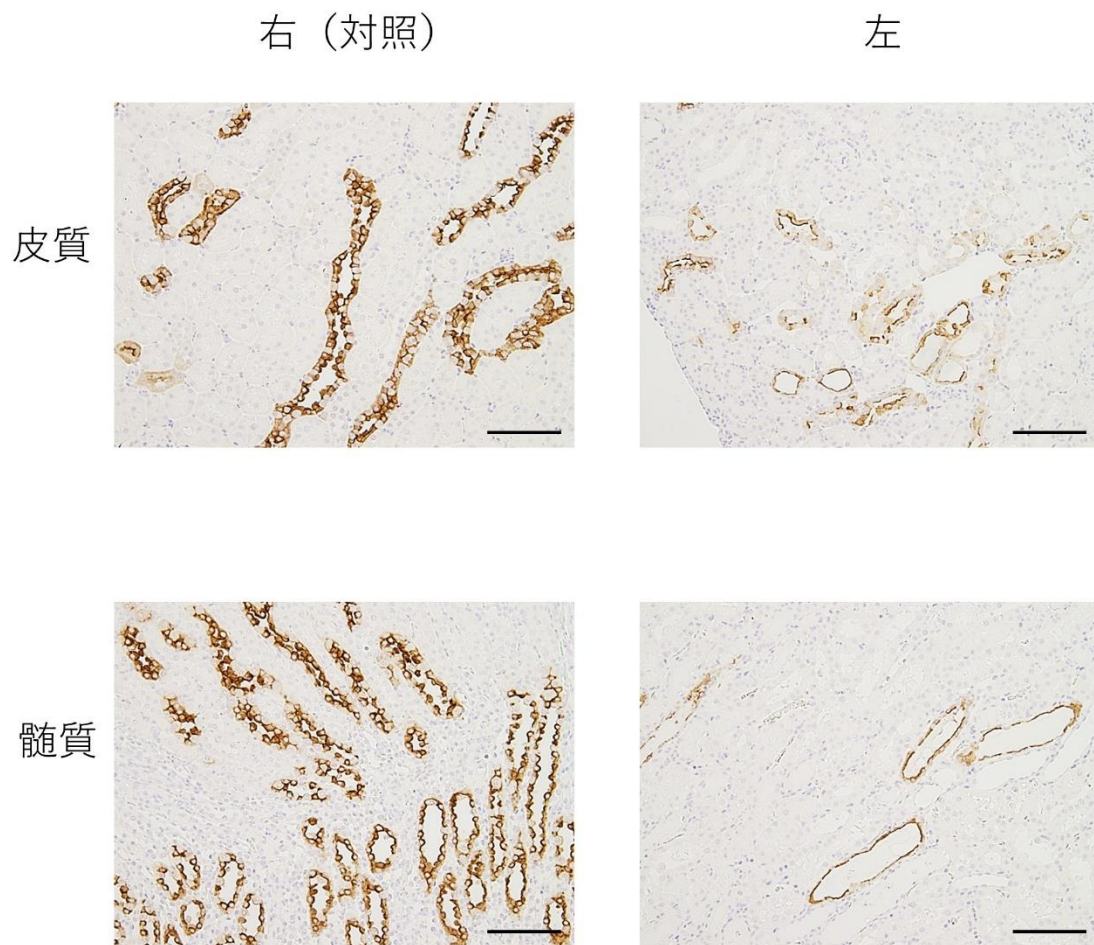


図4 AQP2 の免疫染色所見

AQP2 の免疫染色所見を示した。スケールバー 100 μm 。

図5

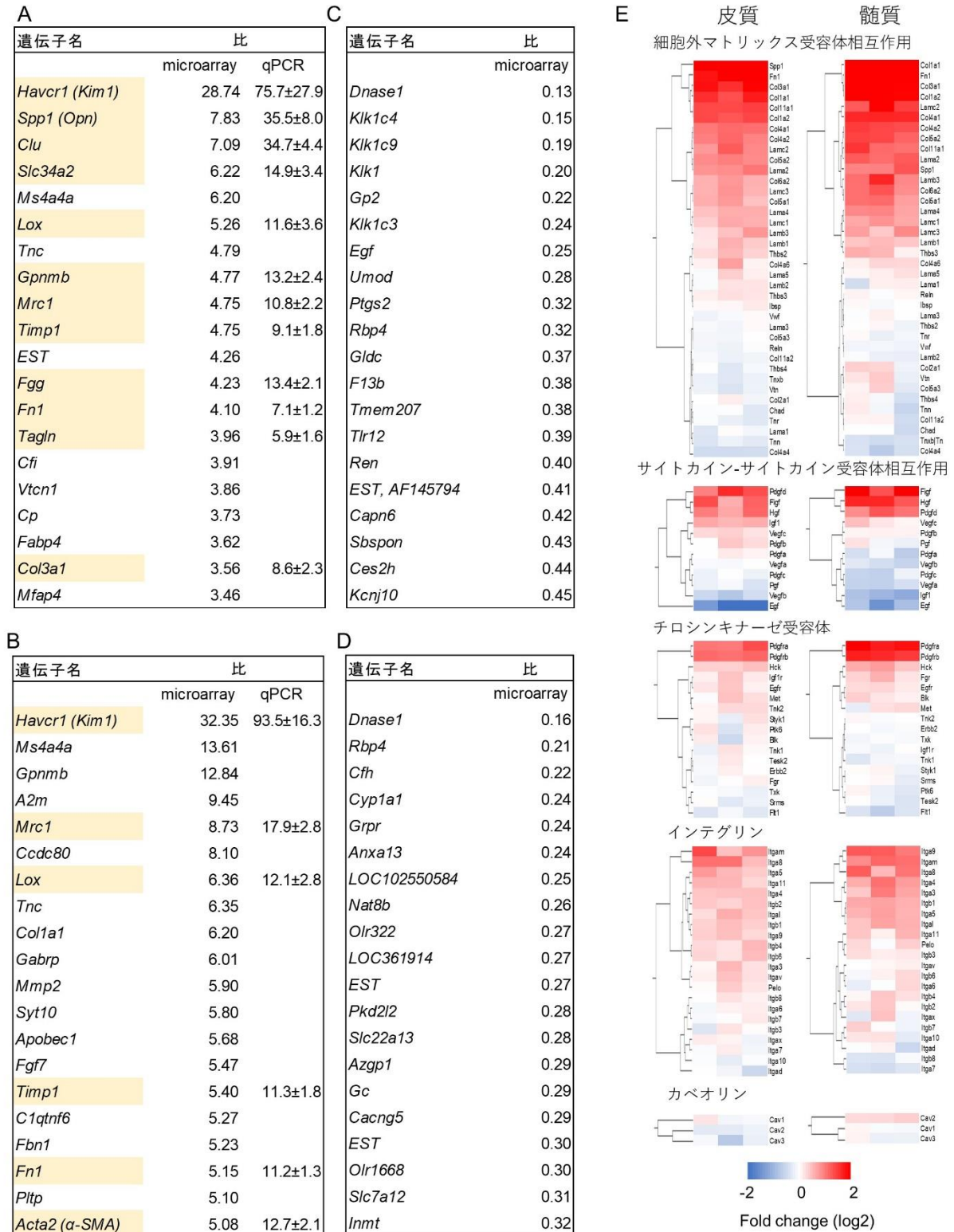


図5 マイクロアレイ解析

(A)皮質において対照腎と比較した際にうっ血腎で発現が亢進した上位 20 遺伝子。(B)髄質において対照腎と比較した際にうっ血腎で発現が亢進した上位 20 遺伝子。(C)皮質において対照腎と比較した際にうっ血腎で発現が抑制された上位 20 遺伝子。(D)髄質において対照腎と比較した際にうっ血腎で発現が抑制された上位 20 遺伝子。左腎の発現レベルと右腎の発現レベルの比を示した。n=3。 EST (expression sequence tag: 発現配列タグ)。黄背景で示した遺伝子は qPCR で発現パターンを確認したものである。各遺伝子の mRNA の発現レベルは *Gapdh* の発現レベルで補正した。n=7。データは平均±標準誤差で示した。(E)マイクロアレイ解析の結果から焦点接着パスウェイ上にある受容体とリガンドに関連する遺伝子を抽出し、発現レベルをヒートマップにして示した。各行は各遺伝子を示し、各列は各個体を示す。n=3。

図6

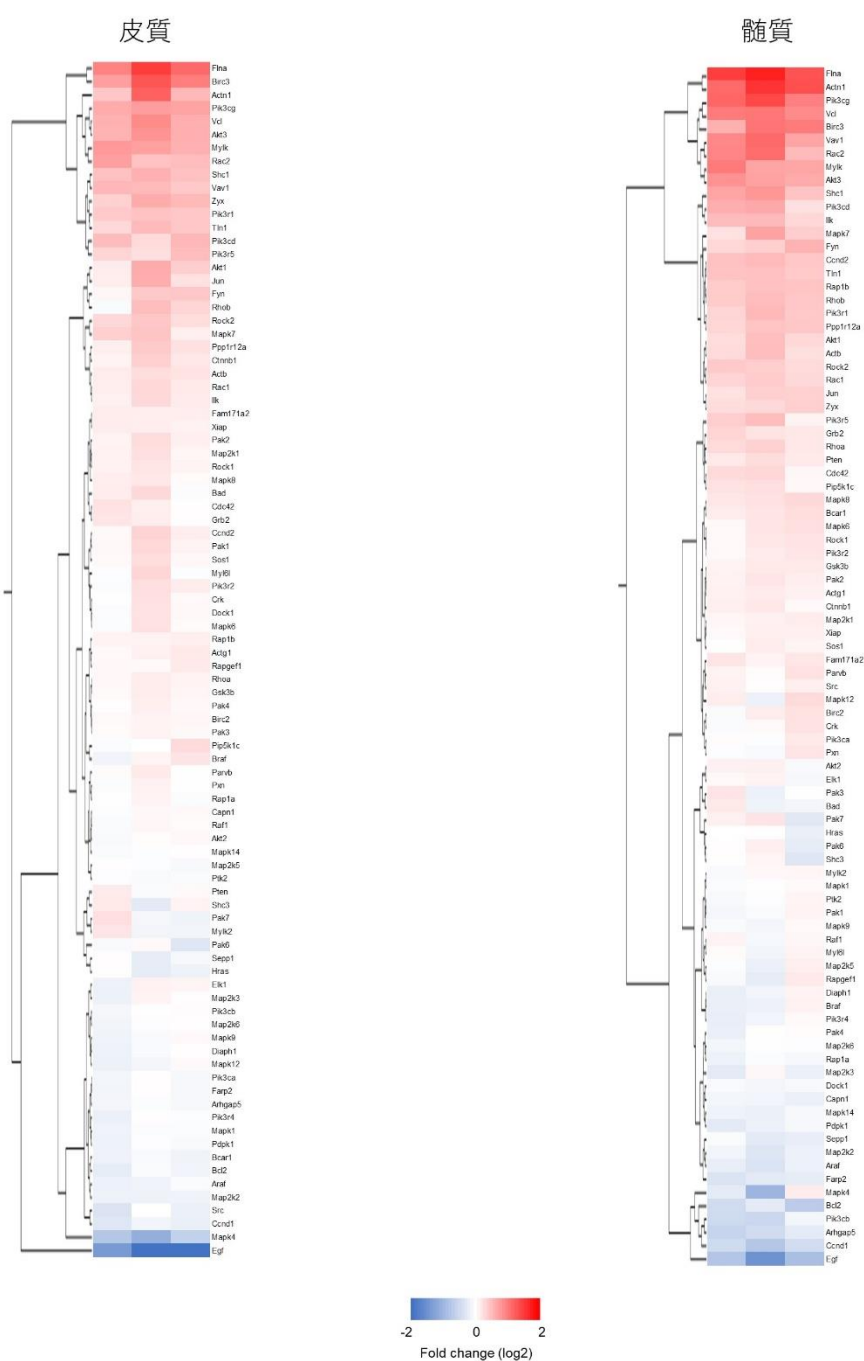


図 6 焦点接着パスウェイのシグナル遺伝子の発現パターン

図 5 にあげた以外の焦点接着パスウェイに存在するシグナルに関連する遺伝子を抽出し、発現レベルをヒートマップにして示した。各行は各遺伝子を示し、各列は各個体を示す。n=3。

図7



図7 レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系に関連する遺伝子の発現パターン

マイクロアレイ解析の結果からレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系に関連する遺伝子を抽出し、左腎と右腎の比をヒートマップで示した。各行は各遺伝子を示し、各列は各個体を示す。n=3。

8

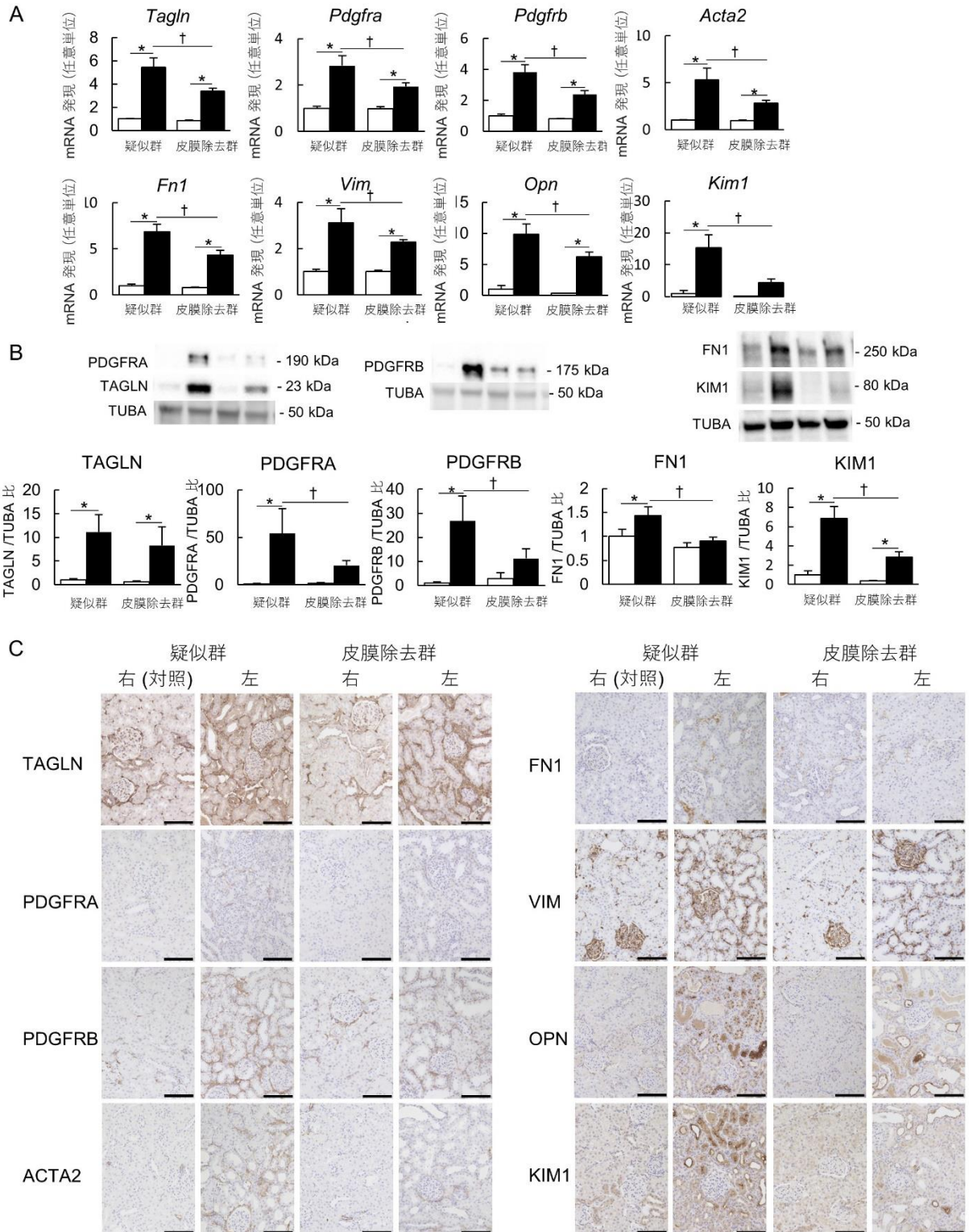
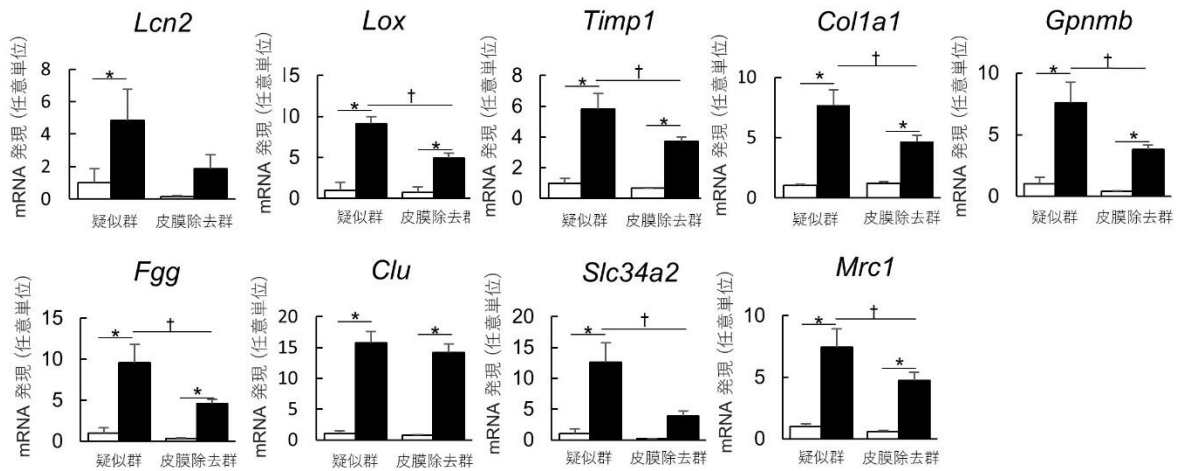


図8 皮膜除去中心静脈結紮モデルの皮質の分子生物学的解析

皮質における(A)*Tagln*、*Pdgfra*、*Pdgfrb*、*Acta2* (α -*Sma*)、*Fnl*、*Vim*、*Opn*、*Kim1* の mRNA 発現レベル、(B) TAGLN、PDGFRA、PDGFRB、FN1、KIM1 のウェスタンブロッティングによるタンパク発現レベルを示した。この解析において、左腎皮膜除去中心静脈結紮モデル(皮膜除去群)と疑似手術中心静脈結紮モデル(疑似群)を比較した。n = 5-7。データは平均+標準誤差で示した。*p < 0.05 対右(対照)、†p < 0.05 対疑似群。チューキー検定。□右(対照)、■左。(C) TAGLN、PDGFRA、PDGFRB、 α -SMA、FN1、VIM、OPN、KIM1 の免疫染色所見。スケールバー 100 μ m。

図9

A 皮質



B 髄質

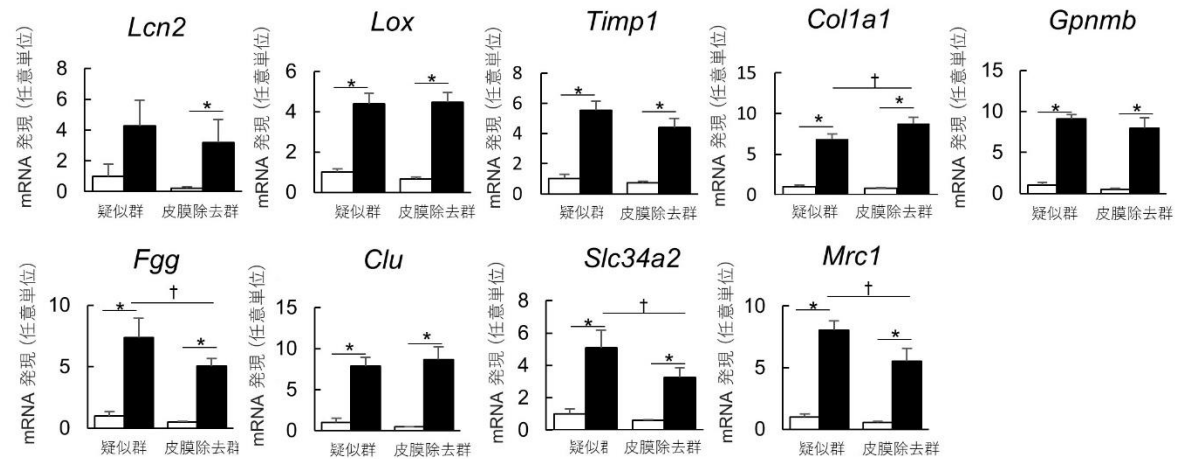


図9 皮膜除去中心静脈結紮モデルの qPCR 所見

図 8、図 10 であげた以外の皮膜除去中心静脈結紮モデルの qPCR 所見を示した。(A)皮質、(B)髄質の所見である。n=5-7。左腎皮膜除去中心静脈結紮モデル(皮膜除去群)と疑似手術中心静脈結紮モデル(疑似群)を比較した。データは平均+標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対右(対照)、† $p < 0.05$ 対疑似群。テューキー検定。□右(対照)、■左。

图10

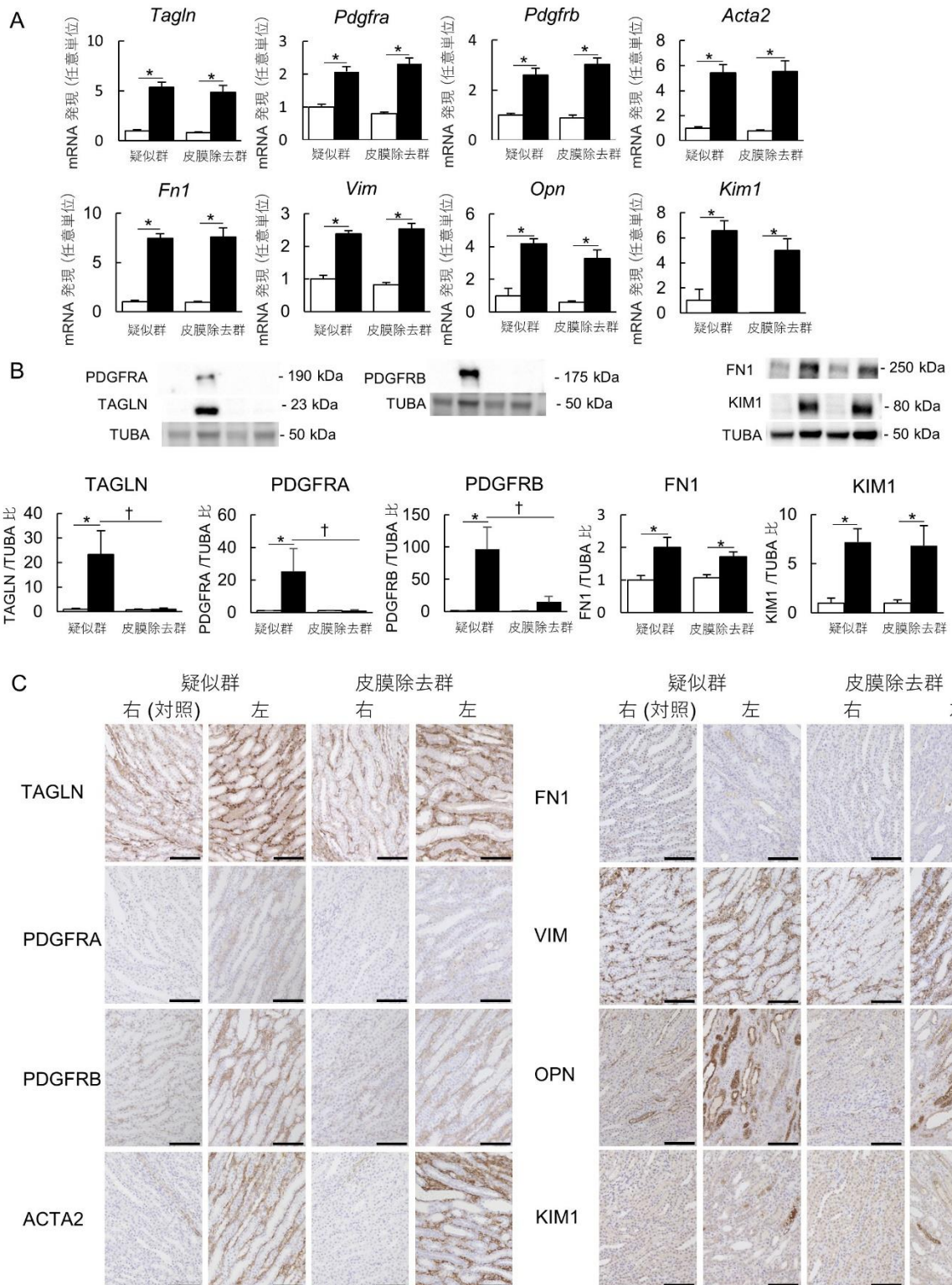
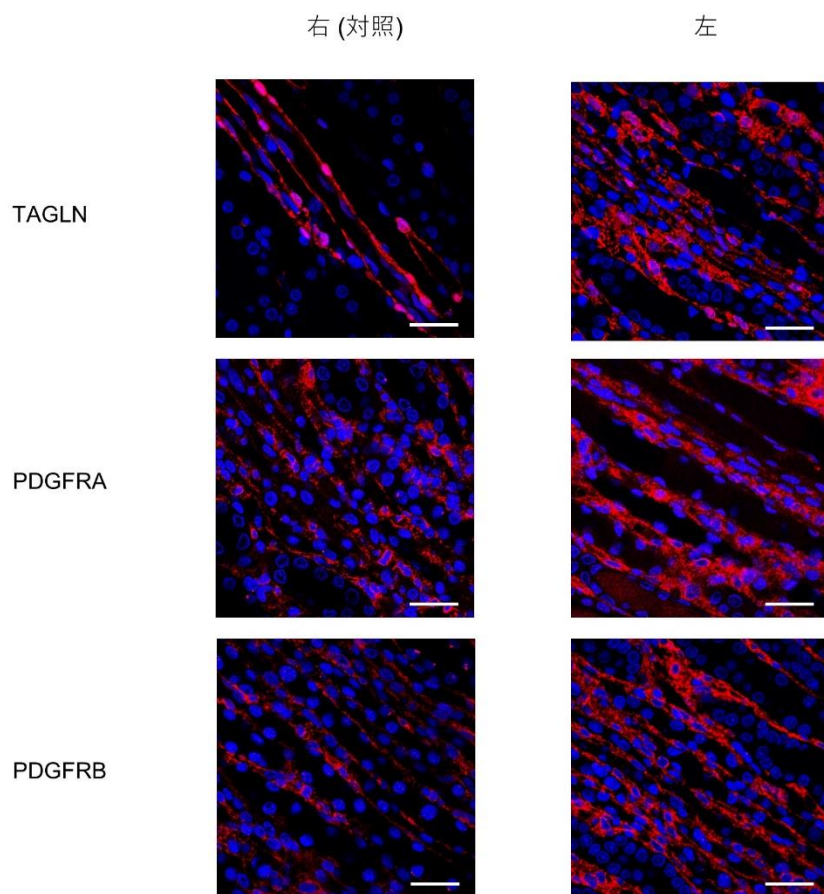


図 10 皮膜除去中心静脈結紮モデルの髄質の分子生物学的解析

髄質における(A) mRNA 発現レベル、(B)ウェスタンブロット解析、(C)免疫染色所見について、皮質で解析した分子と同様のものを示した。n=5-7。データは平均+標準誤差で示した。 $*p<0.05$ 対右(対照)、 $\dagger p<0.05$ 対疑似群。テューキー検定。□右(対照)、■左。スケールバー 100 μm 。

図11

A



B

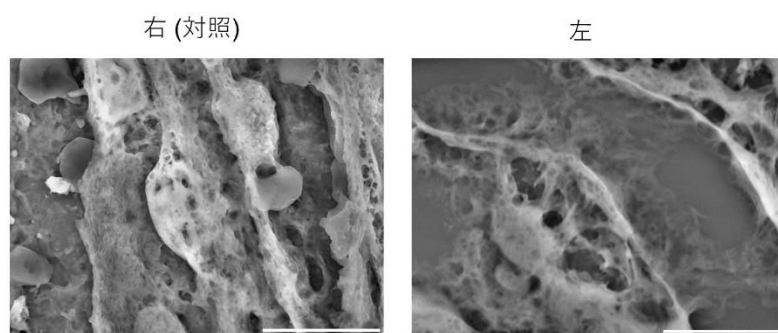
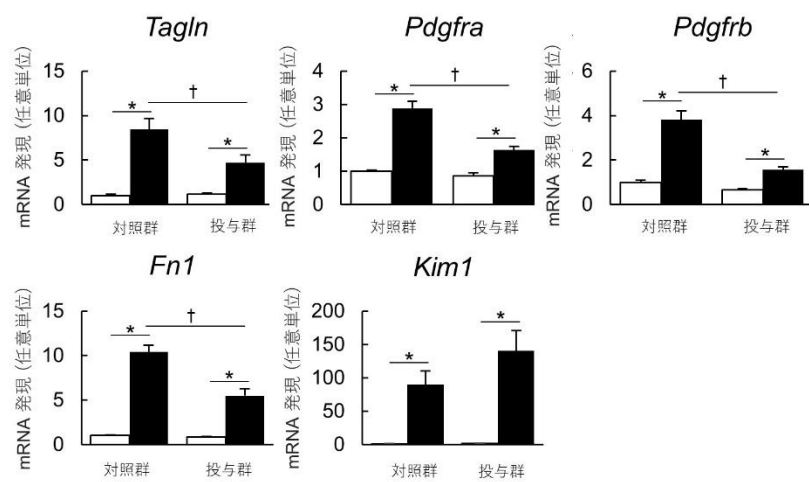


図 11 ペリサイトの脱落

(A) 下降直血管周囲の TAGLN、PDGFRA、PDGFRB 染色所見を示した。スケールバー 25 μm 。(B) 下降直血管周囲のペリサイトの構造を走査顕微鏡で確認した。スケールバー 10 μm 。

图12

A



B

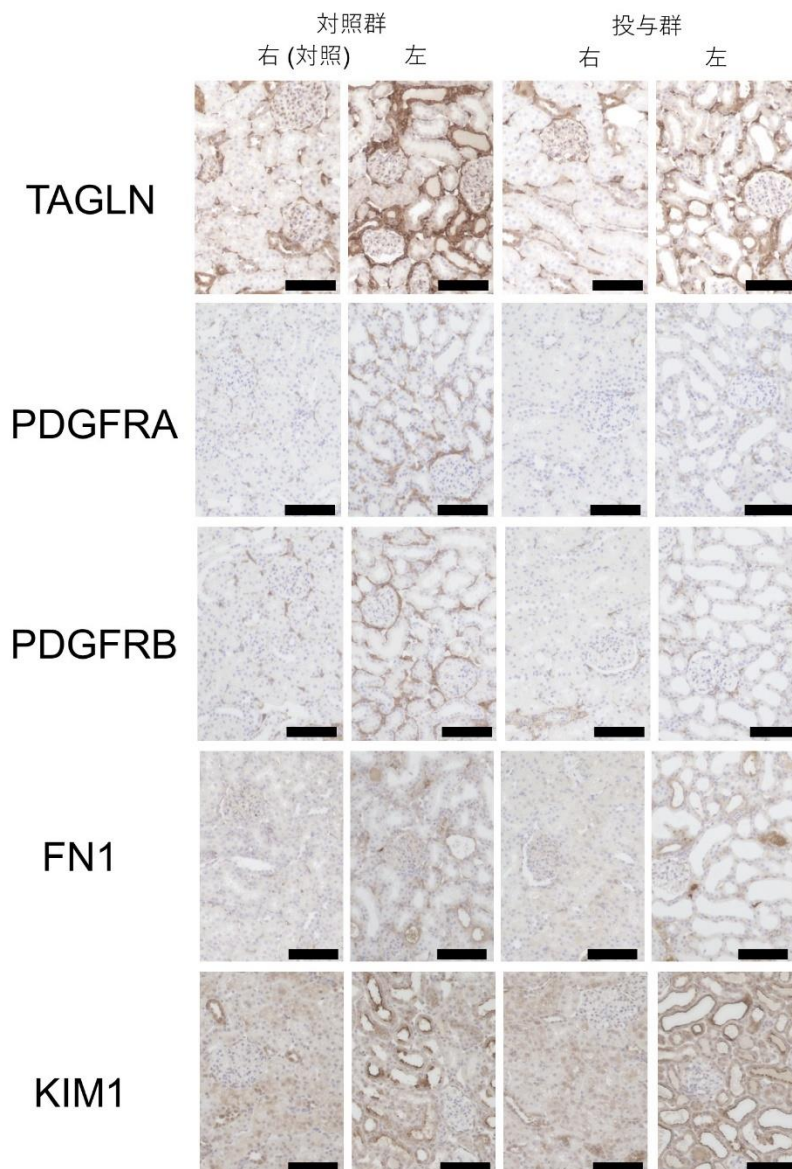
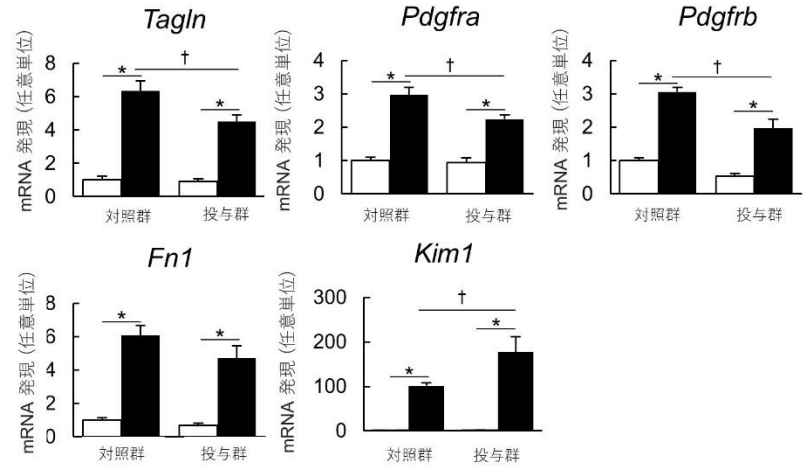


図 12 イマチニブ投与中心静脈結紮モデルの皮質の分子生物学的解析

皮質における(A)*Tagln*、*Pdgfra*、*Pdgfrb*、*Fnl*、*Kim1* の mRNA 発現レベル、(B) TAGLN、PDGFRA、PDGFRB、FN1、KIM1 の免疫染色所見を示した。この解析において、イマチニブ投与中心静脈結紮モデル(投与群)と非イマチニブ投与中心静脈結紮モデル(対照群)を比較した。n=6。データは平均+標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対右(対照)、† $p < 0.05$ 対対照群。チューキー検定。□右(対照)、■左。スケールバー 100 μm 。

图13

A



B

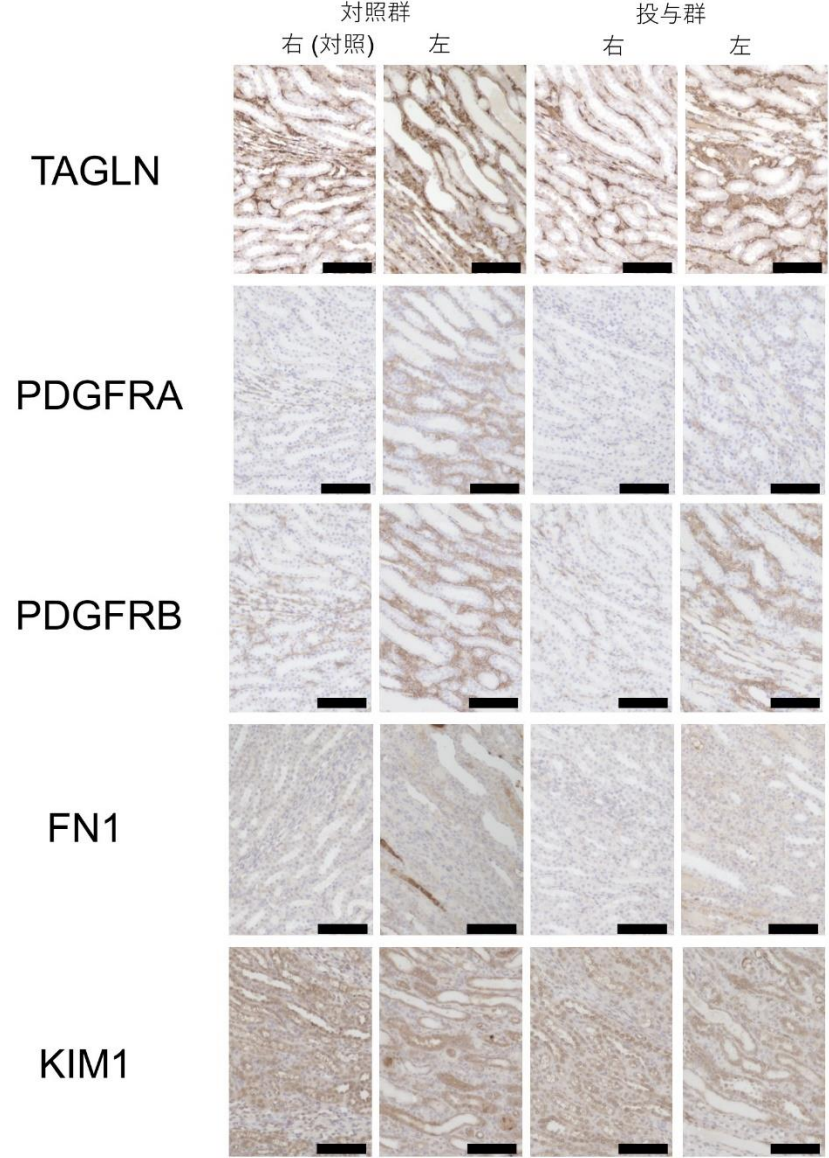
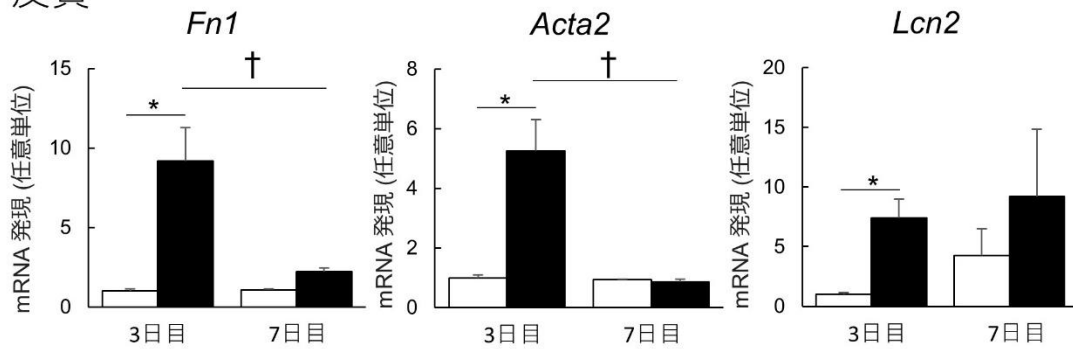


図 13 イマチニブ投与中心静脈結紮モデルの髄質の分子生物学的解析

髄質における(A) mRNA 発現レベル、(B)免疫染色所見について、皮質で解析した分子と同様のものを示した。n=6。データは平均+標準誤差で示した。 $*p<0.05$ 対右(対照)、 $\dagger p<0.05$ 対対照群。テューキー検定。□右(対照)、■左。スケールバー 100 μm 。

図14

A 皮質



B 髄質

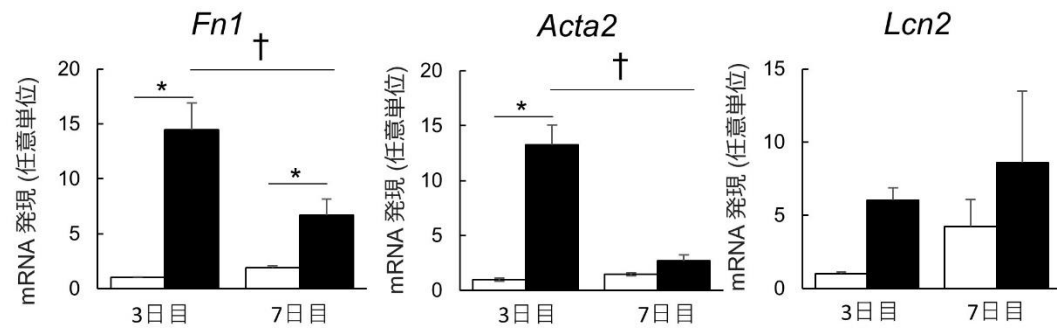
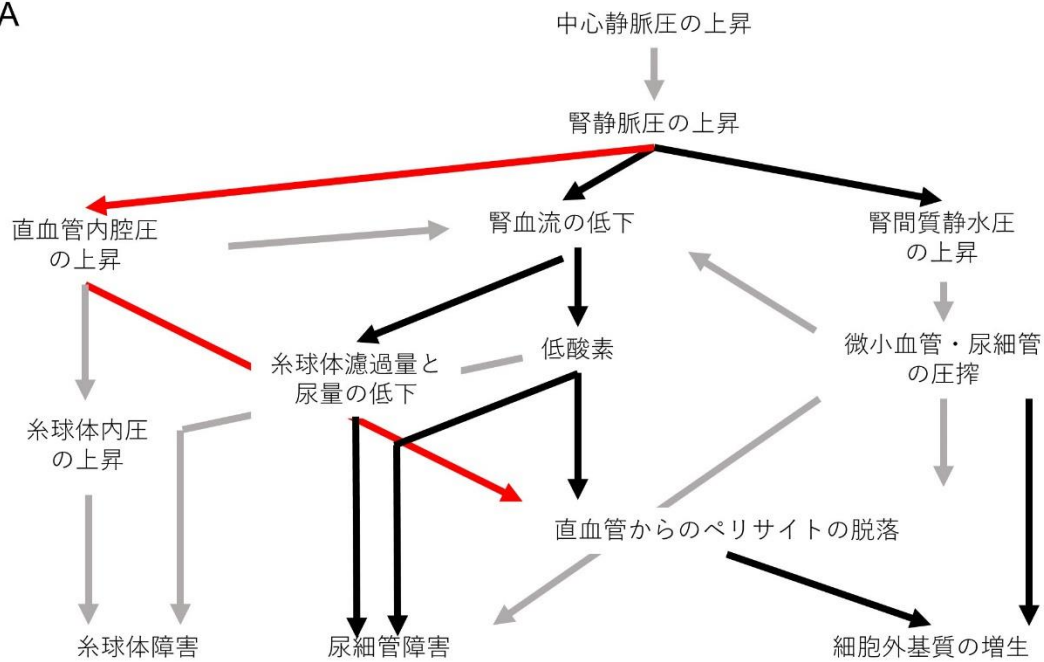


図 14 中心静脈結紮モデルにおける mRNA 発現レベルの経時変化

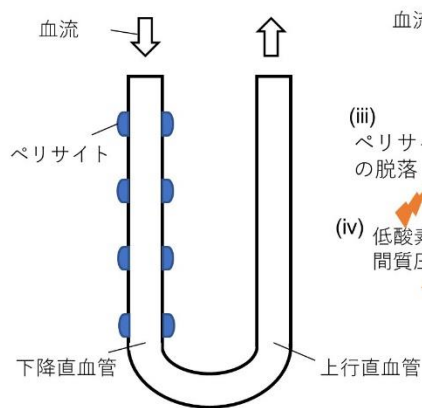
中心静脈結紮後7日目の(A)皮質、(B)髄質それぞれの mRNA 発現を3日目のものと比較した。n=6。データは平均+標準誤差で示した。*p<0.05 対右(対照)、†p<0.05 対対照群。テューキー検定。□右(対照)、■左。

図15

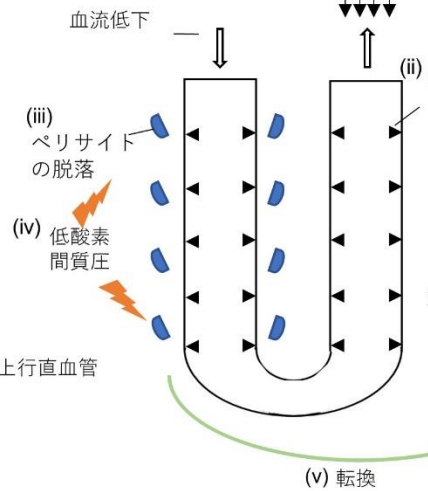
A



B



C



D

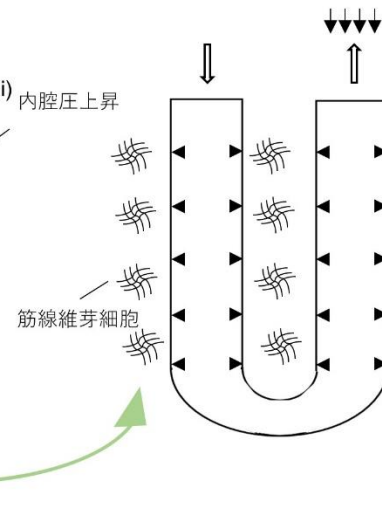


図 15 腎うっ血下の腎障害の機序

(A) 左右腎静脈間中心静脈結紮モデルにおける腎障害について考えられる機序を示した。ペリサイトの脱落が物理的刺激、低酸素、活性酸素種といった様々な要因により引き起こされる。ペリサイトの脱落がペリサイトー筋線維芽細胞転換の引き金となり、細胞外マトリックスの拡大を引き起こす。赤色矢印は本研究で初めて提唱した機序であり、黒色矢印は本研究において既報の再現を行ったもの、灰色矢印は既報で述べられている内容である。(B)-(D) はペリサイト脱落とペリサイトー筋線維芽細胞転換についての模式図である。(B) 通常の状態から、(C) (i) 腎静脈圧が上昇すると、腎血流を低下させ、(ii) 直血管の内腔圧が上昇し、(iii) ペリサイト脱落を引き起こす。(iv) 低酸素、間質静水圧による物理的刺激などが引き金となり、(v) ペリサイトー筋線維芽細胞転換を引き起こす。

XI. 表

表1 プライマーの情報

遺伝子名	primer set ID
<i>Acta2</i>	RA060203
<i>Clu</i>	RA047380
<i>Col1a1</i>	RA065609
<i>Col1a2</i>	RA069679
<i>Col3a1</i>	RA063380
<i>Des</i>	RA058597
<i>Fgg</i>	RA045154
<i>Fn1</i>	RA055827
<i>Gapdh</i>	RA015380
<i>Gpnmb</i>	RA059101
<i>Havcr1 (Kim1)</i>	RA057664
<i>Lcn2 (Ngal)</i>	RA046649
<i>Lox</i>	RA047248
<i>Mmp2</i>	RA068619
<i>Mrc1</i>	RA071208
<i>Pdgfra</i>	RA059727
<i>Pdgfrb</i>	RA048695
<i>Slc34a2</i>	RA062011
<i>Spp1 (Opn)</i>	RA017345
<i>Tagln (SM22)</i>	RA063024
<i>Timp1</i>	RA015383
<i>Vim</i>	RA050877

表2 抗体の情報

抗原	製造元	カタログ番号	ホスト	WB	IHC/IF
ACTA2 (α -SMA)	Dako	M0851	mouse		1: 200
AQP2	Sigma-Aldrich	A7310	rabbit		1: 3000*
DES	Abcam	ab15200	rabbit		1: 200 *
FN1	Merck	F3648	rabbit	1: 1000	1: 400 *
KIM1	R&D system	AF3689	goat	1: 1000	1: 1250*
OPN	Santa Cruz	sc-10591	goat		1: 50
PDGFRA	Cell Signaling	3174s	rabbit	1: 1000	1: 500 *
PDGFRB	Abcam	ab32570	rabbit	1: 1000	1: 100 *
Pimonidazole	Hypoxypore	HP1-100	mouse		1: 50*
TAGLN (SM22)	Abcam	ab14106	rabbit	1: 1000	1: 200*
TUBA	Cell Signaling	3873	mouse	1: 1000	
VIM	Abcam	ab92547	rabbit		1: 1250 *

*は電子レンジによる賦活化を行ったものを示す。

表3 亜急性期の生化学所見

疑似群			結紮群	
血漿中濃度				
TP (g/dL)	5.55±0.22		5.50±0.11	
Alb (g/dL)	3.33±0.11		3.25±0.04	
Cre (mg/dL)	0.25±0.01		0.33±0.02 *	
UN (mg/dL)	14.2±2.2		22.5±0.9*	
Na (mEq/L)	144.6±1.7		143.1±1.4	
IP (mg/dL)	7.83±0.09		7.71±0.19	
	右	左	右	左
尿中濃度				
UP (mg/dL)	101.0±17.1	110.4±20.4	183.5±31.7	157.4±37.1
Alb (μg/mL)	162.1±23.6	182.6±30.1	283.6±67.5	403.0±88.5 †
Cre (mg/dL)	44.3±13.5	41.6±8.6	75.6±17.7	33.0±6.8 †
UN (mg/dL)	1433±351	1408±311	2491±363	846±154 †
Na (mEq/L)	127±26.2	133.3±40.6	99.5±22.2	119±12.7
IP (mg/dL)	313.0±78.7	321.0±89.2	349.8±64.1	26.0±15.8 †‡
尿中総量				
UP (μg/h)	596.9±98.2	618.8±146.9	710.0±91.0	296.4±34.1 †‡
Alb (μg/h)	97.2±14.8	103.3±23.4	104.5±15.9	78.1±8.3
Cre (μg/h)	212.1±31.6	192.4±18.2	292.1±43.7	62.8±8.0 †‡
UN (mg/h)	7.9±1.2	7.4±0.81	10.0±0.86	1.7±0.30 †‡
Na (μEq/h)	86.1±40.5	74.4±25.0	56.5±24.0	26.4±4.7
IP (μg/h)	1829±541	1652±337	1488±266	44.3±2.3 †‡
クレアチニン補正值				
UP (g/gCr)	2.70±0.48	2.89±0.67	2.67±0.51	5.22±0.97 †
Alb (g/gCr)	0.45±0.11	0.49±0.11	0.40±0.08	1.43±0.34 †‡

亜急性期の生化学所見について、疑似手術群(疑似手術群)と中心静脈結紮群(結紮群)で比較をした。n=4-6。データは平均+標準誤差で示した。*p<0.05 対疑似群 (t-検定)。†p<0.05 対右(対照)、‡p<0.05 対疑似群 (テューキー検定)。

表4 皮膚におけるマイクロアレイのGO(Gene ontology: ジーンオントロジー)解析結果におけるGO Termの上位20

GO ACCESSION	GO Term	p-value	corrected p-value	Count in	% Count in	Count in	% Count in Total
GO:0031012	extracellular matrix	5.51E-35	2.26E-30	48	21.2	380	2.0
GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	4.59E-30	9.42E-26	40	17.7	300	1.6
GO:0044420	extracellular matrix component	7.76E-24	1.06E-19	25	11.1	122	0.7
GO:0044421	extracellular region part	1.16E-22	1.19E-18	109	48.2	3628	19.5
GO:0005576	extracellular region	1.91E-21	1.57E-17	113	50.0	4003	21.5
GO:0005581	collagen trimer	5.00E-18	3.42E-14	17	7.5	69	0.4
GO:0005615	extracellular space	1.38E-17	8.08E-14	57	25.2	1322	7.1
GO:0043230	extracellular organelle	4.91E-16	2.52E-12	80	35.4	2619	14.1
GO:0030198	extracellular matrix organization	1.20E-15	5.49E-12	21	9.3	167	0.9
GO:0043062	extracellular structure organization	1.36E-15	5.59E-12	21	9.3	168	0.9
GO:1903561	extracellular vesicle	1.51E-15	5.63E-12	79	35.0	2614	14.0
GO:0005604	basement membrane	1.96E-15	6.69E-12	17	7.5	96	0.5
GO:0070062	extracellular exosome	3.93E-15	1.24E-11	78	34.5	2602	14.0
GO:0006950	response to stress	9.43E-15	2.76E-11	82	36.3	2875	15.4
GO:0031982	vesicle	7.63E-14	2.09E-10	93	41.2	3661	19.7
GO:0031988							
GO:0009605	response to external stimulus	5.95E-13	1.53E-09	61	27.0	1897	10.2
GO:0005539	glycosaminoglycan binding	6.49E-13	1.57E-09	19	8.4	179	1.0
GO:0022610	biological adhesion	9.05E-13	2.06E-09	34	15.0	659	3.5
GO:0009611	response to wounding	1.08E-12	2.34E-09	28	12.4	446	2.4
GO:0002245							
GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	2.69E-12	5.53E-09	11	4.9	43	0.2

表5 皮膚におけるマイクロアレイのGO(Gene ontology: ジーンオントロジー)解析結果におけるGO Termの下位20

GO ACCESSION	GO Term	p-value	corrected p-value	Count in	% Count in	Count in	% Count in Total
GO:0002675	positive regulation of acute inflammatory response	1.82E-05	0.19	3	11.5	37	0.20
GO:0045907	positive regulation of vasoconstriction	3.52E-05	0.19	3	11.5	46	0.25
GO:0005615	extracellular space	4.60E-05	0.19	9	34.6	1322	7.10
GO:0002673	regulation of acute inflammatory response	9.51E-05	0.21	3	11.5	64	0.34
GO:0044421	extracellular region part	9.89E-05	0.21	14	53.8	3628	19.48
GO:0035413	positive regulation of catenin import into nucleus	1.02E-04	0.21	2	7.7	11	0.06
GO:0008217	regulation of blood pressure	1.29E-04	0.22	4	15.4	189	1.01
GO:0070011	peptidase activity, acting on L-amino acid peptides	1.49E-04	0.22	6	23.1	603	3.24
GO:0019229	regulation of vasoconstriction	1.59E-04	0.22	3	11.5	76	0.41
GO:0045177	apical part of cell	1.80E-04	0.22	5	19.2	390	2.09
GO:0008233	peptidase activity	2.01E-04	0.22	6	23.1	637	3.42
GO:1903524	positive regulation of blood circulation	2.06E-04	0.22	3	11.5	83	0.45
GO:0042307	positive regulation of protein import into nucleus	2.98E-04	0.26	3	11.5	94	0.50
GO:0005576	extracellular region	2.98E-04	0.26	14	53.8	4003	21.49
GO:1904591	positive regulation of protein import	3.26E-04	0.26	3	11.5	97	0.52
GO:0044057	regulation of system process	3.74E-04	0.26	5	19.2	457	2.45
GO:0003073	regulation of systemic arterial blood pressure	3.78E-04	0.26	3	11.5	102	0.55
GO:0004175	endopeptidase activity	3.93E-04	0.26	5	19.2	462	2.48
GO:0016809							
GO:0050729	positive regulation of inflammatory response	4.01E-04	0.26	3	11.5	104	0.56
GO:0035412	regulation of catenin import into nucleus	4.66E-04	0.28	2	7.7	23	0.12

表6 髄質におけるマイクロアレイのGO(Gene ontology: ジーンオントロジー)解析結果におけるGO Termの上位20

GO ACCESSION	GO Term	p-value	corrected p-value	Count in	% Count in	Count in	% Count in Total
GO:0031012	extracellular matrix	2.40E-44	1.31E-39	71	16.7	380	2.0
GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	6.09E-35	1.67E-30	56	13.2	300	1.6
GO:0005576	extracellular region	1.48E-32	2.03E-28	200	47.2	4003	21.5
GO:0044421	extracellular region part	1.13E-32	2.03E-28	189	44.6	3628	19.5
GO:0044420	extracellular matrix component	3.30E-25	3.62E-21	32	7.5	122	0.7
GO:0005615	extracellular space	8.63E-24	7.88E-20	94	22.2	1322	7.1
GO:0006950	response to stress	1.12E-22	8.78E-19	146	34.4	2875	15.4
GO:0005581	collagen trimer	1.77E-22	1.21E-18	24	5.7	69	0.4
GO:0009605	response to external stimulus	2.07E-22	1.26E-18	113	26.7	1897	10.2
GO:0009611	response to wounding	1.21E-21	6.63E-18	51	12.0	446	2.4
GO:0002245							
GO:0006952							
GO:0002217	defense response	4.75E-20	2.37E-16	74	17.5	983	5.3
GO:0042829							
GO:0002376	immune system process	3.55E-19	1.62E-15	96	22.6	1594	8.6
GO:0022610	biological adhesion	6.43E-19	2.71E-15	58	13.7	659	3.5
GO:0044707	single-multicellular organism process	7.03E-19	2.75E-15	199	46.9	5036	27.0
GO:0048583	regulation of response to stimulus	1.17E-18	4.26E-15	144	34.0	3099	16.6
GO:0007155	cell adhesion	1.70E-18	5.73E-15	57	13.4	651	3.5
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	1.78E-18	5.73E-15	127	30.0	2561	13.8
GO:0009986	cell surface	5.51E-18	1.68E-14	62	14.6	780	4.2
GO:0009928							
GO:0009929							
GO:0002684	positive regulation of immune system process	1.02E-17	2.94E-14	58	13.7	699	3.8
GO:0048584	positive regulation of response to stimulus	1.28E-17	3.51E-14	96	22.6	1681	9.0

表7 髄質におけるマイクロアレイのGO(Gene ontology: ジーンオントロジー)解析結果におけるGO Termの下位20

GO ACCESSION	GO Term	p-value	corrected p-value	Count in	% Count in	Count in	% Count in Total
GO:0055114	oxidation-reduction process	3.13E-08	8.06E-04	23	18.3	897	4.8
GO:0016491	oxidoreductase activity	1.08E-07	9.54E-04	20	15.9	735	3.9
GO:0044282	small molecule catabolic process	1.11E-07	9.54E-04	12	9.5	246	1.3
GO:0005215	transporter activity	3.88E-07	1.37E-03	25	19.8	1199	6.4
GO:0005478							
GO:0015291	secondary active transmembrane transporter activity	5.11E-07	1.37E-03	11	8.7	232	1.2
GO:0015290							
GO:0015353							
GO:0015404							
GO:0015570	organic anion transport	5.15E-07	1.37E-03	13	10.3	339	1.8
GO:0015711							
GO:0015849	organic acid transport	5.34E-07	1.37E-03	11	8.7	233	1.3
GO:0022892	substrate-specific transporter activity	4.08E-07	1.37E-03	23	18.3	1035	5.6
GO:0044710	single-organism metabolic process	3.36E-07	1.37E-03	42	33.3	2845	15.3
GO:0046942	carboxylic acid transport	4.90E-07	1.37E-03	11	8.7	231	1.2
GO:0006811	ion transport	8.32E-07	1.95E-03	24	19.0	1163	6.2
GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	1.36E-06	2.92E-03	20	15.9	863	4.6
GO:0022857	transmembrane transporter activity	1.50E-06	2.97E-03	21	16.7	949	5.1
GO:0005386							
GO:0015646	ion transmembrane transporter activity	1.80E-06	3.09E-03	19	15.1	800	4.3
GO:0015075							
GO:0015297	antiporter activity	1.75E-06	3.09E-03	7	5.6	85	0.5
GO:0015300							
GO:0006820	anion transport	2.05E-06	3.30E-03	14	11.1	447	2.4
GO:0006822							
GO:0016054	organic acid catabolic process	2.47E-06	3.34E-03	9	7.1	171	0.9
GO:0043436	oxoacid metabolic process	2.24E-06	3.34E-03	19	15.1	812	4.4
GO:0046395	carboxylic acid catabolic process	2.47E-06	3.34E-03	9	7.1	171	0.9

表8 皮膚におけるマイクロアレイのパスウェイ解析の結果における上位20パスウェイ

Pathway	Total	Up	Down	p-value	Significance*
Focal Adhesion	83	68	15	<0.05	10.1
MAPK Signaling Pathway	73	60	13	<0.05	2.4
EGFR1 Signaling Pathway	63	53	10	<0.05	4.3
Electron Transport Chain	59	1	58	<0.05	15.4
Myometrial Relaxation and Contraction Pathways	53	47	6	<0.05	3.7
Regulation of Actin Cytoskeleton	52	44	8	<0.05	3.5
Nuclear factor, erythroid-derived 2, like 2 signaling pathway	52	28	24	0.18	0.7
TNF-alpha NF-kB Signaling Pathway	51	41	10	<0.05	1.4
TGF-beta Receptor Signaling Pathway	51	41	10	<0.05	3.2
B Cell Receptor Signaling Pathway	51	47	4	<0.05	2.6
Insulin Signaling	50	37	13	<0.05	2.2
T Cell Receptor Signaling Pathway	50	43	7	<0.05	4.6
Calcium Regulation in the Cardiac Cell	48	36	12	<0.05	2.8
Androgen Receptor Signaling Pathway	45	34	11	<0.05	5.1
Wnt Signaling Pathway NetPath	39	33	6	<0.05	3.0
IL-3 Signaling Pathway	38	35	3	<0.05	3.3
Cytoplasmic Ribosomal Proteins	36	35	1	<0.05	4.0
Oxidative phosphorylation	36	0	36	<0.05	9.7
Integrin-mediated cell adhesion	35	30	5	<0.05	2.5
Adipogenesis	35	23	12	0.21	0.7

* Significance はp値の負の常用対数を表す。